

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Control de la concentración de los receptores de glucagón  
por los niveles circulantes de la hormona**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Ángel Santos Montes**

DIRECTOR:

**Enrique Blazquez Fernández**

**Madrid, 2015**



530607308X

com

CONTROL DE LA CONCENTRACION DE LOS RECEPTORES DE GLUCAGON POR LOS NIVELES  
CIRCULANTES DE LA HORMONA.

VºBº

EL PONENTE

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL  
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS -  
BIOLOGICAS

POP.

ANGEL SANTOS MONTES

FDO. DR. ANGEL MARTIN MUNICIO

MADRID, DICIEMBRE DE 1980.



N. 23. 180

A ANA.



V°B°

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Blazquez", with a large, sweeping flourish underneath.

Esta Tesis ha sido realizada en  
el Instituto Gregorio Marañón -  
del Consejo Superior de Inves-  
tigaciones Científicas bajo la  
dirección del Dr. Enrique Blazquez  
Fernandez.

En primer lugar deseo vivamente manifestar mi profundo agradecimiento al Dr. Enrique Blazquez Fernandez por su dirección, apoyo y constante estímulo y enseñanza durante la realización del presente trabajo.

Quiero asimismo manifestar mi agradecimiento a mis compañeros de trabajo y a todas las personas que me han alentado en la realización de este trabajo.

Asimismo de una forma especial a Eloy, por su colaboración en la preparación de las muestras para el microscopio electrónico.

También deseo mostrar mi agradecimiento al Dr. Angel Martín Muncio por aceptar presentar este trabajo y por su revisión del manuscrito. Asimismo deseo mostrar mi agradecimiento al Dr. Jorge Tamarit Torres por sus correcciones y consejos.

I N D I C E

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	3
1.- Concepto de receptor	4
1.1.- Antecedentes históricos	4
1.2.- Introducción del concepto de receptor en Endocrinología	5
2.- Problemas metodológicos	6
2.1.- Selección del material biológico adecuado	6
2.2.- Marcaje de la hormona	11
3.- Localización del receptor	15
4.- Interacción hormona-receptor : Características	24
5.- Degradación de la hormona	24
6.- Naturaleza del receptor	27
7.- Sistema efector o catalítico	30
8.- Relación estructura-actividad de la hormona	38
9.- Modificaciones de la concentración de los receptores hormonales	42
OBJETIVOS	48
MATERIAL Y METODOS	52
1.- Reactivos	53
2.- Animales	54
3.- Marcaje de las hormonas con $^{125}\text{I}$	54
3.1.- Marcaje de insulina con $^{125}\text{I}$	54
3.2.- Purificación de mono $^{125}\text{I}$ -inaulina	57
3.3.- Marcaje de glucagón con $^{125}\text{I}$	60
3.4.- Purificación de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón	62

4.- Obtención de membranas plasmáticas de hígado de rata	63
5.- Obtención de hepatocitos	66
6.- Estudios de interacción de las hormonas con membranas hepáticas y hepatocitos	68
6.1.- Separación del complejo hormona-receptor de la hormona libre	70
6.2.- Estudios de degradación de la hormona	71
7.- Determinación de la actividad adenilato ciclase en membranas y células hepáticas	72
8.- Métodos analíticos	74
8.1.- Determinación de insulina	74
8.2.- Determinación de glucagón	76
8.3.- Determinación de AMPc	77
8.4.- Determinación de proteínas	79
8.5.- Determinación de la actividad 5'nucleotidasa	80
8.6.- Determinación de glucosa	81
RESULTADOS	82
1.- Estudios con membranas plasmáticas de hígado de rata	83
1.1.- Proceso de purificación de las membranas plasmáticas de hígado	83
1.1.1.- Índices de pureza: actividad 5'nucleotidasa y unión de mono <sup>125</sup> I-glucagón	83



1.2.- Interacción de glucagón e insulina con membranas plasmáticas de hígado	87
1.2.1.- Asociación y disociación de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón	87
1.2.2.- Degradación de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón y del receptor de glucagón	90
1.2.3.- Afinidad y número de receptores para glucagón	93
1.2.4.- Unión de mono $^{125}\text{I}$ -insulina	96
1.3.- Actividad biológica de glucagón en membranas plasmáticas de hígado	96
1.3.1.- Estimulación de la actividad adenilato ciclase por glucagón	96
2.- Estudios en hepatocitos aislados	99
2.1.- Interacción de glucagón con hepatocitos aislados	99
2.1.1.- Asociación y disociación de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón	99
2.1.2.- Degradación de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón	102
2.1.3.- Afinidad y número de receptores para glucagón	104
2.2.- Actividad biológica en hepatocitos aislados de rata	106
2.2.1.- Efecto del glucagón sobre la producción de AMPc	106
2.2.2.- Efecto del glucagón sobre la producción de glucosa	108

2.2.3.- Efecto del AMPc sobre la producción de glucosa	110
3.- Estudios con hepatocitos aislados prein- cubados en medio 199	110
3.1.- Interacción del glucagón y la insulina con hepatocitos preincubados previa- mente en medio 199 con o sin glucagón	112
3.1.1.- Unión de mono $^{125}$ I-glucagón	112
3.1.2.- Unión de mono $^{125}$ I-glucagón a hepatocitos incubados con dife- rentes concentraciones de glucagón	114
3.1.3.- Degradación de mono $^{125}$ I-glucagón	116
3.1.4.- Unión de mono $^{125}$ I-insulina	118
3.1.5.- Afinidad y número de receptores para glucagón	120
3.2.- Actividad biológica de glucagón en hepatocitos preincubados con o sin glucagón	122
3.2.1.- Efecto del glucagón sobre la producción de AMPc	122
3.2.2.- Efecto de la L-adrenalina sobre la producción de AMPc	124
3.3.- Efecto de la preincubación con ciclo- heximida y glucagón	124
3.3.1.- Efecto de glucagón y ciclohexi- mida sobre la síntesis de pro- teínas en hepatocitos	124

3.3.2.- Unión de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón a hepatocitos preincubados pre- viamente con glucagón y ciclo- heximida	127
3.3.3.- Afinidad y número de receptores para glucagón en hepatocitos preincubados previamente con glucagón y cicloheximida	129
4.- Niveles circulantes de glucagón e insulina y glucemia en ratas tratadas y controles	132
DISCUSION	134
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFIA	168

A B R E V I A T U R A S

AMP : adenosina 3'monofosfato.

AMPC : adenosina 3'5' monofosfato ciclico.

ATP : adenosina 5'trifosfato.

EDTA : ácido etilen diamino tetraacético.

GDP : guanosina 5'difosfato.

GTP : guanosina 5' trifosfato.

GMPPNHP : guanosina 5'difosfato imido fosfato.

POPOP : 1,4bis 2-(5-fenil oxazolil)-benceno.

PPO : 2,5 difenil oxazol.

TCA : acido tricloroacético.

TRIS : tris-hidroximetil- aminometano.

VIP : peptido intestinal vasoactivo.

## I N T R O D U C C I O N

## 1.- CONCEPTO DE RECEPTOR.

### 1.1.- Antecedentes históricos.

Un pionero en la introducción del concepto de receptor fue Langley ( LANGLEY, 1905 ) que lo empleó para obtener una mejor comprensión del mecanismo de acción de las drogas al nivel molecular. De acuerdo con ello, un agente activo induce solamente un efecto farmacodinámico en un objeto biológico como resultado de su interacción con ciertas moléculas del objeto biológico que denominamos receptores o punto receptores. Sin embargo, el término no nos indica nada sobre su naturaleza y características y enfatiza realmente nuestro desconocimiento de él. Además este concepto es transitorio en muchos casos en Farmacología y una vez conocida la naturaleza del mismo deja de ser el receptor para pasar a ser realmente el objeto con el cual interacciona la sustancia activa.

Este mismo concepto para Endocrinología deriva de los trabajos iniciales sobre la acción de las catecolaminas ( AHLQUIST, 1968 y MORAN, 1966 ), e inicialmente incluía un sistema efector. En la actualidad, se refiere únicamente al aspecto de reconocimiento de la hormona, desligado del sistema efector o catalítico. Además carece de la transitoriedad que puede poseer en Farmacología ya que son estructuras que poseen las células blanco de la acción hormonal y cuya misión es precisamen-

te reconocer a la hormona de una forma específica y con la afinidad adecuada, lo que constituye el primer paso en la acción hormonal .

### 1.2.- Introducción del concepto de receptor en Endocrinología

Fueron los experimentos de Stadie ( STADIE y col., 1949) los que pueden tomarse como la primera prueba de la unión de una hormona ( insulina ) a su tejido blanco o diana. Estos autores observaron que el efecto glucogénico de la insulina se mantenía en el músculo diafragmático de la rata después de lavar y eliminar por completo la insulina. Por tanto, parecía que esta hormona quedaba fuertemente unida a sus ~~recep~~tores en el músculo diafragmático. Estos mismos autores demostraron que la insulina marcada permanecía unida al diafragma a pesar de los persistentes lavados ( STADIE y col., 1952 y STADIE y col., 1953 ). Sin embargo, se dudaba de que la unión de insulina observada tuviera relación con la actividad biológica, ya que aumentaba la unión a medida que se aumentaba la cantidad de hormona marcada, aún utilizando cantidades de hormona muy por encima de las concentraciones que producen una actividad biológica máxima ( FERREBEE y col., 1951 y GARRAT y col., 1966 ). Por otro lado, se demostró que la acción de la insulina en corazón de rata aislado y perfundido cesaba rápidamente una vez que se dejaba de infundir la hormona ( BLECHEN y FISHER, 1954 ). Había, por tanto, razones importantes para dudar de que la retención de la hormona -



observada fuera debida a la unión a su receptor y tuviera que ver con la acción biológica. Se arguyó, que la unión inespecífica era muy alta por adsorción de la proteína a superficies orgánicas e inertes y que ello podía enmascarar la unión al receptor, unión específica ( WOHLTMANN y NAHARA, 1966 ).

Gran parte de las dificultades iniciales que impidieron un rápido avance de los estudios de las interacciones hormona-receptor procedían de la utilización de un material poco adecuado, tejido intacto o cortes tisulares muy finos. Este tipo de material posee muchos elementos no blanco de la acción hormonal que la unen inespecíficamente, y además hay graves inconvenientes para la libre difusión de la hormona, con lo que su desaparición por lavados se ve obstaculizada.

## 2.- PROBLEMAS METODOLOGICOS.

### 2.1.- Selección del material biológico adecuado.

Ya hemos comentado, que el tejido intacto o cortes finos del mismo no son un material adecuado para el estudio de la interacción de la hormona-receptor. Habitualmente solo se emplea en estudios cualitativos o semicuantitativos, cuando la cantidad de tejido es tan pequeña que hace imposible o muy difícil el aislamiento de células o la obtención de material particulado ( EISEN y col., 1973 ). También, los estudios pueden -

realizarse "in vivo" tras la inyección intravenosa de la hormona sobre todo cuando el receptor resulta lábil a los procesos de obtención de células y membranas.

Los materiales biológicos más utilizados son las células y membranas plasmáticas aisladas del órgano diana de la acción hormonal, aunque en otros tipos de estudios se puede utilizar el receptor solubilizado.

Las células aisladas al eliminar las barreras de difusión disminuye mucho la unión inespecífica de la hormona y tienen la gran ventaja de que constituyen un material biológico relativamente poco manipulado y, sobre todo, metabólicamente activo con lo cual, con el mismo material se pueden determinar la interacción hormona-receptor y hormona-actividad biológica simultáneamente, lo que no es posible hacer para todas las hormonas peptídicas con preparaciones de membranas. Sin embargo, esto no soslaya por completo el problema de la heterogeneidad, ya que muchas veces es difícil separar los distintos tipos celulares presentes en un determinado tejido u órgano y los ensayos han de llevarse a cabo en presencia de células que no son blanco de la acción hormonal. Las células se obtienen habitualmente por digestión del tejido u órgano con colagenasa (RODBELL, 1964 y BERRY y FRIEND, 1969), aunque también se pueden emplear otros métodos como la disrupción mecánica (KAHN, 1975). La fracción cruda de colagenasa habitualmente utilizada está contaminada con proteasas, que contribuyen de forma importante a la acción digestiva de la colagenasa. Se ha descrito que la tripsina modi-

fica la sensibilidad del receptor y otras funciones de la membrana ( KONO, 1969 y CUATRECASAS e ILLIANO, 1971 ) y es lógico pensar, por tanto, que las proteasas contaminantes podrían alterar la función del receptor u otras funciones de la membrana con lo que serían dudosos los resultados obtenidos con este tipo de material. Sin embargo, salvando las diferencias de sensibilidad a las proteasas de los distintos receptores hormonales, por digestión con colagenasa se obtienen células que son plenamente capaces de responder a la hormona, al igual que lo hace el tejido intacto, como veremos de forma más detallada en la Discusión de este mismo trabajo.

Para el estudio de los receptores en humanos se emplean células sanguíneas con lo que se evitan los problemas que puedan derivarse de la digestión con colagenasa. El empleo de células cultivadas tiene la ventaja de que pueden utilizarse poblaciones homogéneas, pero plantean el problema de que en muchos casos son células tumorales o transformadas y su comportamiento puede ser diferente ( KRUG y col., 1972 ).

Como es sabido, el receptor para las hormonas peptídicas y las catecolaminas se haya fundamentalmente en las membranas plasmáticas de las células blanco y por tanto, este material parece muy adecuado para el estudio de la interacción hormona-receptor. La obtención de las membranas plasmáticas se lleva a cabo fundamentalmente siguiendo el procedimiento descrito por Neville Jr. ( NEVILLE Jr., 1968 ) para la obtención de membranas plasmáticas de hígado, el cual fue posteriormente

modificado y adaptado para la obtención de membranas plasmáticas de otros tejidos u órganos.

Las proteínas de la membrana plasmática constituyen solo un 0,3-0,5% de las proteínas totales de la célula ( NEVILLE Jr. y KAHN, 1974 ) por tanto, el receptor está enormemente concentrado en este tipo de material, con lo que se puede utilizar muy diluido y disminuir mucho la unión inespecífica y la degradación de la hormona lo que suponen dos importantes ventajas con respecto a otros materiales. Además este material se puede mantener a baja temperatura y utilizar repetidamente de forma que se pueden hacer múltiples ensayos con la misma muestra, aunque algunos autores han descrito cierta inestabilidad de este material durante la congelación ( GLOSSMAN y col., 1974 ). No obstante, al ser un material relativamente manipulado en algunos casos las propiedades del receptor pueden modificarse ( ROY y col., 1973 y VERPIER y col., 1974 ).

No hay que olvidar tampoco que incluso las membranas más puras contienen de un 5-10% de contaminantes, mientras que las fracciones menos purificadas pueden llegar a contener hasta un 90% de proteínas que no son de la membrana plasmática ( NEVILLE y KAHN, 1974 ), y que estas membranas pueden ser heterogéneas, ya que todos los tipos celulares del órgano utilizado contribuyen al contenido de la preparación final. Además, el proceso de purificación de las membranas plasmáticas es un proceso selectivo y se puede obtener una población de membranas plasmáticas no representativa de la membrana total ya que la -

membrana puede ser heterogénea en la misma célula ( WISHER y EVANS, 1975 y CHANG y col., 1975 ). Por todo ello es necesario realizar un control adecuado del proceso de purificación de las mismas ( NEVILLE, 1975 ) utilizando ~~marcadores~~ enzimáticos, morfológicos y de otros receptores hormonales además del que se desee estudiar ( KAHN y col., 1973 ). Sin embargo, el inconveniente mayor que plantea el uso de membranas plasmáticas es que en muchos casos se pierde la respuesta biológica a la hormona lo que impide realizar un estudio comparativo entre unión de la hormona al receptor y efecto biológico.

El receptor hormonal solubilizado a partir de las membranas plasmáticas purificadas no es un material utilizado de forma rutinaria para estudiar la interacción hormona-receptor, sino que es un primer paso en el proceso de purificación del receptor que nos permitirá estudiar su composición y características. Dicho material plantea problemas propios como es el hecho de que los detergentes utilizados para solubilizarlo pueden alterar la estructura y, por tanto, la actividad de las proteínas de la membrana ( HELENIUS y SIMONS, 1975 ), aunque parece que el receptor de insulina solubilizado retiene las propiedades de unión de la hormona que posee cuando está integrado en membranas o células ( FREYCHET, 1976 ). Por otro lado, la existencia de micelas de detergente hace que la hormona pueda unirse a ellas y detectemos como unión al receptor lo que es unión a las micelas ( GIORGIO y col., 1974 ). Sin embargo, la solubilización del receptor en algunos casos puede tener venta-

jas como la disminución de la unión inespecífica debida a la adsorción a sustancias inertes ( LEFKOWITZ, 1970 ). Pero en todo caso, su interés radica en ser el primer paso en el proceso de purificación del receptor. Por otro lado, a pesar de los criterios que se siguen para determinar la solubilidad del receptor, es posible que este no lo encontremos en estado fundamental, ya que pequeñas vesículas de la membrana o complejos lipoproteicos resultantes de la misma cumplan los criterios utilizados para definir la solubilización.

## 2.2.- Marcaje de la hormona

Vimos que en los primeros estudios de interacción - hormona-receptor se dudaba de la especificidad de los resultados obtenidos y que ello era debido en parte a la utilización de un material biológico no adecuado. Pero por otro lado, se carecía de la seguridad de que la hormona ~~marcada~~ fuera un trazador válido de la hormona nativa. Algunos autores con el fin de soslayar este problema intentaron el estudio de la unión de la hormona a las células blanco utilizando hormona no marcada. - Para ello, se medía la desaparición por radioinmunoensayo de la hormona del medio pero, de todos modos resultaba muy difícil distinguir entre lo que era hormona realmente unida y lo que era hormona degradada ( ANTONIADES y GERSHOFF, 1966 y CROFFORD, 1968 ). Por tanto, fue necesario obtener la hormona marcada con una alta actividad específica, lo que permitió trabajar -

con concentraciones fisiológicas de la misma, y con una eficacia biológica.

Los dos isótopos que más se han utilizado para marcar hormonas polipeptídicas son el  $^{131}\text{I}$  y el  $^{125}\text{I}$ , ya que ambos - poseen una alta actividad específica y son fáciles de incorporar a proteínas. También se han utilizado otros isótopos pero con menor frecuencia que los isótopos del yodo, ya que con ellos se obtienen actividades específicas muy inferiores ( KAHN, 1975) y no ofrecen mejores ventajas en otros terrenos. De los dos - isótopos del yodo, en la actualidad es el  $^{125}\text{I}$  el más empleado ya que tiene una vida media mayor y a pesar de que el  $^{131}\text{I}$  tiene una actividad específica superior las preparaciones comerciales son mucho más impuras ( FREYCHET, 1976 ).

Se utilizan distintos métodos para incorporar el yodo a la proteína, lo que generalmente ocurre en la posición - orto de los residuos tirosina. De ellos, el más ampliamente - utilizado es el método de la cloramina T ( HUNTER y GREENWOOD, 1962 ], que utiliza dicho agente oxidante , con diversas modificaciones tendentes a suavizar las condiciones del marcaje para que el agente oxidante primero y el agente reductor que se añade después no dañen la hormona ( ROTH, 1973 ). Este método adaptado para el marcaje de insulina y glucagón se describe detalladamente en el apartado dedicado a ello en Material y Métodos.

También se utiliza ampliamente la lactoperoxidasa para incorporar el yodo a proteínas, ya que este enzima es ca-

paz de oxidar el yoduro utilizando como donador el peróxido de hidrógeno e incorporarlo a los restos tirosina ( THORELL y JOHANSSON., 1971 ). Parece ser que en su acción la lactoperoxidasa a diferencia de otras peroxidases, implica la formación de un complejo con el residuo tirosina de la proteína ( MORRISON y BAYSE, 1970 ) y, por tanto, es más específico para este residuo. En algunos casos se han obtenido mejores resultados con este método ( SUTcliffe y col., 1973 y BANERJEE y col., 1975 ) frente al de la cloramina T, pero en otros ha ocurrido lo contrario ( LAMBERT y col., 1972 ). De todas formas, carecemos de un trabajo de comparación sistemática de ambos métodos.

Otra posibilidad que se ha utilizado y que puede resultar de utilidad, es el marcaje con  $^{125}\text{I}$ , pero no directamente, con lo que no se expone la proteína a la acción de los agentes oxidantes. El  $^{125}\text{I}$  se incorpora previamente a un éster de la N-hidroxi succinimida, que con posterioridad se hace reaccionar con la proteína ( BOLTON y HUNTER, 1973 ).

Sin embargo, no hemos contestado a la pregunta de si la hormona marcada como hemos descrito posee las mismas propiedades frente al receptor que la hormona no marcada. La actividad biológica se ha investigado en numerosas hormonas iodadas y, en general, la hormona mono-iodada retiene, sino toda, al menos una parte importante de la actividad biológica de la hormona no marcada. La actividad biológica disminuye, en términos



generales, a medida que aumenta el grado de iodación, lo que es lógico dadas las alteraciones que la adición de un átomo de iodo puede causar en la estructura de la molécula.

En el caso de glucagón, la iodación aumenta su actividad biológica, lo que se debería a un aumento de su afinidad por el receptor y a una disminución de su degradación ( BROMER y col., 1973 y DESBUQUOIS, 1975 ). El aumento de la actividad biológica sería progresivo a medida que aumenta el grado de iodación, hasta 4 átomos de iodo por molécula de glucagón, a partir de donde comenzaría a disminuir. Pero sin embargo, el aumento depende del método utilizado y con el de la cloramina T, el glucagón moniodado solo sería ligeramente más activo que el nativo ( DESBUQUOIS, 1975 ). Según otros autores, el mono iodo-glucagón sería igual de activo que el no marcado (RODELL y col., 1971 y LIN y col., 1975 ).

En cuanto a la insulina, desde un principio se llamó la atención sobre la posibilidad de que la hormona iodada no tuviera las mismas propiedades que la hormona no marcada y parecía que era así, al menos, cuando se marcaba fuertemente ( LEE, 1959 ). Un marcaje más suave en el que la incorporación de iodo sea menor de 1 átomo/molécula de insulina parece que evita la pérdida de actividad ( GARRAT, 1964 y IZZO y col., 1964 ). Sin embargo, en estos casos los autores no separaron la hormona marcada de la no marcada, y cuando se incorpora menos de 1 átomo de iodo/molécula de insulina hay un elevado porcentaje de insulina que no se marca y que podría ser respon-

530607308X

sable de la actividad biológica detectada. Otros autores purificándola encontraron una disminución de su actividad ( ARQUILLA y col., 1968 y LAMBERT y col., 1972 ). Con una purificación más cuidadosa de la mono iodo-insulina se ha demostrado ampliamente que no hay pérdida apreciable de su actividad biológica frente a la hormona no marcada ( BIHLER y MORRIS, 1972 y SO-DOYEZ y col., 1975 ). La incorporación del iodo a la insulina - ocurre en los residuos tirosina de la cadena A y, en condiciones suaves en el residuo A-14 y no en el A-19. La incorporación en el resto A-19 puede provocar importantes cambios estructurales e inactivar la hormona, dado el papel que este juega en la misma ( BLUNDELL y col., 1972 ). Esto no ocurre cuando la incorporación se lleva a cabo en el residuo A-14 ( HAMLIN y - ARQUILLA, 1974 ).

### 3.- LOCALIZACION DEL RECEPTOR.

Que el receptor de las hormonas polipeptídicas se halla fundamentalmente en la membrana plasmática de las células diana es un hecho perfectamente establecido y son muchas las evidencias que lo apoyan.

Los antisueros contra las hormonas inhiben la acción de estas en el tejido blanco aunque ya haya comenzado la acción de la misma ( PASTAN y col., 1966 ).

La digestión de los adipocitos con tripsina inhibe

la acción de la insulina sobre ellos ( KONO, 1969 ), aunque la estructura celular permanece intacta y no se altera la acción de otros agentes ( RENNER, 1973 ). Los resultados son los mismos cuando se utiliza tripsina ligada a agarosa ( CUATRECASAS, 1972 ).

Cuando se liga la hormona a polímeros insolubles, incapaces de penetrar en la célula, esta mantiene su actividad biológica ( SCHIMER y col., 1968, CUATRECASAS, 1969 y JOHSON y col., 1972a). Por tanto, parece claro que la hormona ejerce su acción primaria al nivel de la membrana plasmática. Estos resultados han sido criticados en base a que la hormona ligada a estos polímeros se puede liberar ( KATZEN y VLAHAKES, 1973 ).

Con el descubrimiento del AMPc y de la adenilato ciclasa y su implicación en la regulación del metabolismo de la glucosa en hígado por glucagón y catecolaminas, se dió un avance muy importante en la comprensión de cómo las hormonas podrían regular el metabolismo celular a través de su interacción con la membrana ( SUTHERLAND y RALL, 1960 y SUTHERLAND y col., 1962 ). Se formuló la hipótesis del "segundo mensajero" por la cual, las concentraciones de AMPc presentes en el interior de la célula diana serían proporcionales al efecto de la hormona sobre sus receptores. A su vez, este nucleótido - sería el causante de los efectos hormonales ( ROBISON y col., 1968 ).

Cuando se purifican las membranas plasmáticas, el receptor hormonal se purifica con ellas, lo que constituye la

evidencia más directa de la localización subcelular del receptor ( CUATRECASAS, 1971 y FPEYCHET y col., 1971 ). Con la membrana plasmática también se purifica la adenilato ciclase y por tanto, en la membrana se halla todo el sistema necesario para la respuesta a algunas hormonas ( POHL y col., 1971 ).

Con la hormona marcada con ferritina o conjugada con compuestos fluorescentes y la posterior observación microscópica se puede ver que el sitio de unión de la hormona es la membrana plasmática ( JARETT y SMITH, 1975 y SCHLESSINGER y col., 1978 ) y que su distribución no es uniforme ( JARETT y SMITH, 1977 ).

La situación del receptor y del efector ( adenilato ciclase ) es asimétrica , como se deduce del estudio de la acción de la tripsina en adipocitos y sus membranas ( RODBELL y col., 1970 y BENNETT y CUATRECASAS, 1973 ). Por otra parte, parece claro que los componentes receptor y efector son diferentes entidades ya que la adenilato ciclase en adipocitos es sensible a varias hormonas y todas ellas actuarían sobre la misma unidad catalítica, pero a través de diferentes receptores hormonales, lo que hace difícil concebir que todos ellos sean un mismo elemento junto con el elemento catalítico ( BIRNBAUMER y RODBELL, 1969 ). Además en ratas hipofisectomizadas se pierde la respuesta de adenilato ciclase a la ACTH en el adipocito, pero no a glucagón o adrenalina, lo que sugiere que la unidad catalítica y el receptor son diferentes y están sometidos a di-

ferente control en su síntesis y degradación ( BRAUN y HECHTER, 1970 ).

Aunque los receptores para hormonas polipeptídicas se encuentran fundamentalmente en las membranas plasmáticas de las células blanco, también se han encontrado en diversas organelas intracelulares ( KAHN y col., 1973 y BERGERON y col 1973 ). Las características de estos receptores son las mismas que las de los de la membrana plasmática ( GORDEN y col., 1980 ), a diferencia de lo que ocurre con los receptores de insulina encontrados en el núcleo de los hepatocitos ( VIGNERI y col., 1972 ). Los receptores hormonales del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi se encuentran al parecer en la parte interna de la membrana lo que sugiere que podrían ser los precursores del receptor en la membrana plasmática. Para los receptores del núcleo se ha sugerido que podrían estar relacionados con las acciones a largo plazo de la hormona ( GORDEN y col., 1980 ). Para que estos receptores intracelulares sean activos, la hormona debe ser accesible a ellos. Parece ser que la hormona es capaz de penetrar en las células blanco, al menos en algunos casos, y que para ello se requiere previamente la unión al receptor en la membrana plasmática. Sin embargo, la hormona internalizada no se localiza en las estructuras que contienen los receptores, sino en los lisosomas lo que ha sugerido a algunos autores que dicha internalización del complejo hormona-receptor y su posterior degradación podría ser el mecanismo implicado en la regulación del número de receptores por

los niveles circulantes de la hormona homóloga ( GORDEN y col. 1980 ).

#### 4.- INTERACCION HORMONA-RECEPTOR: CARACTERISTICAS

El aislamiento de los receptores hormonales en cantidades suficientes que permitan su caracterización está en los momentos actuales en sus incios, dadas las pequeñas cantidades en que se encuentran y las dificultades de trabajar con proteínas integrales de la membrana. Por esta razón, el receptor es definido por lo que hace y no por lo que es. Y son estas características en su acción lo que lo define y lo que obviamente nosotros empleamos para caracterizarlo. Las características que habitualmente se incluyen son :

- La unión de la hormona al receptor es rápida y reversible. Su afinidad está en armonía con su acción biológica.
- El número de receptores es finito.
- Se localizan en los tejidos blanco de la acción hormonal.
- Es específico.
- La unión de la hormona al receptor se correlaciona con la acción biológica de la misma.

La unión de la hormona al receptor es un proceso dependiente de la temperatura, tanto en la cantidad que se une como en la afinidad con que lo hace ( KAHN y col., 1974, CUA-

TRECASAS, 1971 y RODBELL y col., 1971 ). Cuando se añade hormona fría en exceso, se elimina del medio o se acidifica este, la unión de la hormona al receptor se revierte rápidamente, lo que se corresponde con la rápida reversibilidad de la acción hormonal cuando se retira la hormona del medio ( KAHN y col., 1974 y RODBELL y col., 1971 ). En algunos casos la unión parece - prácticamente irreversible, como es el caso del glucagón unido a membranas plasmáticas de hígado ( RODBELL y col., 1971 ), - sin embargo, el proceso de reversión se acelera cuando se añade EDTA y cuando se añade GTP o ATP, lo que nos sugiere que el proceso de unión y separación de la hormona del receptor es un proceso más complicado, en el que pueden intervenir otros elementos aparte de la hormona y el receptor.

La afinidad de las ~~hormonas~~ polipeptídicas por su receptor es alta, del orden de  $10^8$ - $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , lo que se corresponde bien con sus concentraciones en plasma ( GAVIN III y col., 1973 y KAHN, 1976 ).

El número de receptores hormonales es finito y muy - variable de unas hormonas a otras y para una misma hormona en los diferentes tejidos blanco de la acción hormonal ( GAVIN III y col., 1973 y KAHN, 1976 ). Además, su distribución a lo largo de la membrana no es uniforme como hemos descrito anteriormente. Sin embargo, sus aspectos cuantitativos son complejos, - ya que aunque añadamos un gran exceso de hormona no marcada - siempre permanece una pequeña cantidad de hormona marcada unida,

que es lo que denominamos "unión inespecífica" y no tiene relación alguna con la actividad biológica de la hormona.

La afinidad y número de receptores de las hormonas polipeptídicas se calculan fundamentalmente a partir de los datos de unión de la hormona al receptor en el equilibrio y con diferentes concentraciones de hormona. Estos datos se representan posteriormente según Scatchard. Cuando el receptor es homogéneo y no existen interacciones entre ellos y siempre que ocurra lo mismo con la hormona la representación de Scatchard es una línea recta, siendo la pendiente la afinidad y la intersección con el eje de abscisas el número de receptores. Esto es así para algunas hormonas como la del crecimiento, calcitonina, prolactina, etc... ( KAHN, 1975 y KAHN, 1976 ). Sin embargo, no ocurre lo mismo para otras hormonas como la insulina, el glucagón, la tirotropina ( TSH ), etc... ( KAHN, 1975, KAHN, 1976 ), donde la representación de Scatchard es una curva de tipo cóncavo. La interpretación de este tipo de curvas es complejo. En algunos casos, como es el de la insulina, la causa sería la existencia de un fenómeno de cooperatividad negativa entre los receptores de la misma, que se pone de manifiesto en el proceso de disociación que es acelerado por la presencia de hormona no marcada en el medio ( De MEYTS y col., 1973 y De MEYTS y col., 1976 ]. En otros casos, no parece que la causa de este fenómeno sea la cooperatividad negativa entre los receptores, como es el caso de glucagón y se acepta en principio la existencia



de dos tipos de receptores con diferente afinidad por la hormona, que por otro lado, es la explicación más general de este tipo de curvas ( SONNE y GLIEMAN, 1977 ). Evidentemente esta aceptación no implica una definición de lo que son los dos tipos de receptores, si realmente son diferentes y con distinta función o es el mismo receptor en dos situaciones diferentes en la membrana con o sin funciones determinadas. En todo caso, parece poco probable que la heterogeneidad observada sea debida a la hormona.

El receptor se localiza en la membrana plasmática de las células diana, pero es necesario tener en cuenta que en la actualidad se están reconociendo receptores hormonales en tejidos no reconocidos tradicionalmente como blanco de la hormona ( ILLIANO y col., 1973 ). Incluso hay casos de tejidos - donde se detectan buen número de receptores para una determinada hormona, pero no le es conocida ninguna función a la misma en ellos ( POSNER y col., 1974 y SHIN y FRIESEN, 1974 ).

La especificidad es una propiedad fundamental de los receptores hormonales, de tal forma que podemos afirmar que - cada hormona posee su propio receptor del cual solo puede ser desplazada por ella misma y no por otras hormonas, aunque su estructura sea muy similar como es el caso del glucagón, secretina y VIP ( DESBUQUOIS y col., 1973 y RODBELL y col., 1971 a ). Derivados de una hormona, análogos u hormonas de distintas especies que poseen diferente actividad biológica son reconocidas por el receptor con afinidades diferentes y correlativas a su

potencia biológica, lo que constituye una clara evidencia de esta especificidad ( FREYCHET y col., 1971 y FREYCHET y col., - 1974 ). Sin embargo, hay excepciones que violan esta regla de la especificidad, al menos en el sentido tan estricto en que la hemos formulado, como son los casos de hormonas que actúan a través de un mismo receptor u hormonas que presentan un cierto grado de reacción cruzada con los receptores de otras (RAO y SAXENA, 1973, LESNIAK y col., 1974, HINTZ y col., 1972 y MEGGESI y col., 1975 ).

Si bien hemos definido algunas características de la interacción hormona-receptor la unión de la hormona a dicho receptor debe estar relacionada con su acción biológica. Es necesario interpretar con cautela los resultados de unión de la hormona a un posible receptor ya que algunos autores ( CUATRECASAS y HOLLENBERG, 1975 ) han descrito el caso de determinados materiales inertes capaces de unir insulina de forma que es desplazable por insulina a bajas concentraciones y no por otras hormonas.

La unión de la hormona al receptor se relaciona con la actividad biológica y se puede demostrar de diferentes formas. Debe existir un paralelismo entre la unión y la actividad biológica a una determinada concentración de la hormona. En algunos casos dicha correlación parece lineal ( GLODFINE y col., 1972 ), pero los datos son difíciles de conciliar con el rango de concentraciones fisiológicas en que se mueve la hormona. Además la correlación para una determinada hormona puede variar

en función de la actividad biológica que se determine ( MOYLE y col., 1978 ) y, por tanto, quizás no sea el camino más adecuado para demostrar la correlación unión-actividad biológica. - Existe una correspondencia entre la unión, determinada por la afinidad, y la acción biológica de diferentes derivados y análogos de una determinada hormona o bien la hormona de diferentes especies ( CUATRECASAS, 1971a, FREYCHET y col., 1971, FREYCHET y col., 1975 ). Sin embargo, no debe olvidarse que existen análogos hormonales capaces de unirse al receptor, pero que apenas ponen en marcha la acción biológica. Estos análogos son los antagonistas.

Existen determinados agentes capaces de modificar la unión y la acción biológica de la hormona de forma paralela. Así la tripsina modifica la unión y la acción biológica de la insulina en los adipocitos ( CUATRECASAS, 1971b) o el efecto causado por diferentes agentes sobre la unión de glucagón y la activación de la adenilato ciclasa ( RODBELL y col., 1971 ).

##### 5.- DEGRADACION DE LA HORMONA.

De una forma continua las hormonas peptídicas son degradadas en mayor o menor medida en el organismo, con lo que se logra hacer más puntual la respuesta metabólica a los cambios en los niveles hormonales.

El material biológico que se utiliza para llevar a cabo los estudios de interacción hormona-receptor normalmente posee la capacidad de degradar la hormona, y en algunos casos, como glucagón, es el centro fundamental de la degradación de la hormona ( ASSAN, 1972 y POHL y col., 1972 ). Por tanto, debemos preguntarnos en qué medida este hecho nos puede alterar los resultados que se obtienen en el estudio de la interacción hormona-receptor. La degradación, si es un proceso importante, puede alterar las concentraciones reales de hormona en el medio, y por tanto, puede dar lugar a datos erróneos. De hecho, parece ser que en algunos casos la inhibición del proceso degradativo - aumenta la unión de la hormona y su actividad biológica a concentraciones no saturantes de la misma, pero el número de receptores es el mismo. Otros autores dudan de que incluso se detecte alteración en la afinidad ( DESBUQUOIS y col., 1974 ). No parece, por otro lado, que lo que detectamos como unión al receptor pueda considerarse como contribución de la unión de la hormona a su sistema degradativo, ya que cuando se altera la degradación no se modifica el número de receptores. Por otra parte, la afinidad de la hormona por el sistema degradativo es menor que por el receptor, y parece lógico que no interfiera con el receptor al menos en las concentraciones normalmente utilizadas.

El sistema de degradación de la insulina y del glucagón presentes en la membrana plasmática de la célula diana no está bien caracterizado. En el caso de glucagón, se sabe que dicho sistema

degradativo ( POHL y col., 1972 ) es diferente del sistema degradativo presente en la fracción soluble del hepatocito ( Mc DONALD y col., 1969 ), pero se desconoce como el sistema presente en la membrana es capaz de degradar glucagón ( POHL y col., 1972 ). Por otro lado, el sistema degradativo de glucagón es diferente del de recepción ( DESBUQUOIS y CUATPECASAS, 1972 ).

Para insulina ocurre algo similar, aunque no existe acuerdo sobre si el sistema capaz de degradar la insulina presente en la membrana plasmática de las células diana es una actividad proteasa o es la glutatión-insulina transhidrogenasa ( DUCKWORTH, 1979 y VAPANDANI, 1973 ). Existe acuerdo en que el sistema degradativo y el ~~receptor~~ son elementos diferentes, pero es polémica la participación del receptor en dicho proceso de degradación. Según unos autores, el receptor no interviene en el proceso de degradación de la insulina, ya que su afinidad por la hormona es mucho mayor que la determinada para el sistema de degradación; la insulina se disocia del receptor en forma activa; y no existe una correspondencia entre la afinidad de diferentes análogos por el receptor y su degradación ( FREYCHET y col., 1972 y OLEFSKY y col., 1975 ). Sin embargo, para otros autores sería el complejo hormona-receptor el sustrato de la acción del sistema degradativo de insulina ( TERRIS y STEINER, 1975 y DIAL y col., 1977 ).

## 6.- NATURALEZA DEL RECEPTOR.

Ya hemos comentado anteriormente que la purificación de los receptores hormonales está en sus etapas iniciales y, - por tanto, no es conocida su naturaleza y estructura de forma - detallada siendo el conocimiento que tenemos de ellos fragmen- tario y debido a estudios indirectos.

Todos los receptores para las hormonas polipeptídicas son susceptibles en mayor o menor medida a la acción de las - proteasas, tripsina fundamentalmente, de tal forma que estas inhiben la unión de la hormona a ellos y su acción biológica - ( KONO, 1969 y RODBELL y col., 1971 ).

La neuraminidasa no afecta la unión de insulina a su receptor aunque sí afecta su acción biológica ( CUATRECASAS e ILLIANO, 1971 ), lo que sugiere que los residuos de ácido siá- lico no son componentes determinantes del receptor de insulina. Cuando la digestión se lleva a cabo con neuraminidasa y  $\beta$ -ga- lactosidasa si hay una disminución en la unión de insulina a su receptor que se corresponde con una disminución de su acti- vidad biológica ( CUATRECASAS, 1974 ). Esto nos sugiere la exis- tencia de restos de galactosa en el receptor de insulina, y su naturaleza glicoproteica.

El receptor de insulina no es sensible a la acción de las fosfolipasas o a la extracción de los fosfolípidos, sino que la desaparición de estos aumenta la unión de insulina debi- do a la exposición de los receptores situados en las porciones

más interna de la membrana ( CUATRECASAS, 1971a). Sin embargo, el papel que juegan los fosfolípidos en otros receptores es muy importante, tal es el caso del receptor de glucagón. La digestión de las membranas hepáticas con fosfolipasas o el tratamiento con digitonina disminuye la unión de glucagón a las mismas y su acción biológica ( RODBELL y col., 1971, RUBALCAVA y RODBELL, 1973 ), recuperándose dichos efectos con la adición de fosfolípidos ( POHL y col., 1971a). Cuando se utiliza fosfolipasa C de *Bacillus cereus*, que solo hidroliza los fosfolípidos ácidos, se inhibe por completo la respuesta de la adenilato ciclasa a glucagón, cosa que no ocurre con otras fosfolipasas que hidrolizan los fosfolípidos neutros ( RUBALCAVA y RODBELL, 1973 ). También se produce una ~~disminución~~ disminución de la unión de glucagón ya que se altera la afinidad de la hormona por el receptor, pero no se altera el número total de sitios, por lo que parece que los fosfolípidos no son parte directa del receptor. Además, el efecto de GTP sobre la unión de glucagón desaparece, sin embargo no se afecta en absoluto la unión de deshistidina glucagón. De todo ello ~~parece~~ deducirse que los fosfolípidos ácidos estarían implicados en un sitio de unión del residuo histidina N-terminal de glucagón y del GTP, lo que modularía la unión de glucagón a su receptor. De otro lado, los fosfolípidos ácidos también estarían implicados en la activación de la adenilato ciclasa por glucagón, pero no por otros estímulos como el NaF ( RUBALCAVA y RODBELL, 1973 ). Estos resultados se ven confirmados por el hecho de que cuando se solu-

biliza la adenilato ciclasa se pierde la respuesta a glucagón, pero no a NaF ( LEVEY, 1970 ) y se recupera, al menos parcialmente, con la adición de fosfolípidos ( LEVEY, 1971 ). Estos resultados de forma indirecta se ven confirmados cuando se intenta purificar el receptor.

Aunque se ha descrito la solubilización del receptor de insulina en monocitos en ausencia de detergentes ( GAVIN III y col., 1972 ) no es esto lo que ocurre normalmente, por lo que es necesario solubilizarlo con detergentes. Son los detergentes no iónicos los que mejores resultados han dado (KAHN 1975 ), ya que son los que menos modifican la estructura de las proteínas de la membrana ( HELENIUS y SIMONS, 1975 ). La solubilización de los receptores plantea algunos problemas ya que hay algunos que pierden su afinidad por la hormona después de la solubilización ( DUFAY y CATT, 1973 y JOHNSON y col., 1972 ) y se complican los ensayos posteriores, ya que la hormona se puede unir al detergente y detectarse como si fuera unión al receptor ( GIORGIO y col., 1974 ). Aparte de las dificultades originadas por la necesidad de utilizar detergentes para solubilizar los receptores antes de iniciar su purificación, hay otra gran dificultad que es la escasez de los mismos frente a otras proteínas de la membrana. Sería necesario purificarlos unas 250.000 veces para obtener preparaciones de receptor medianamente puras ( KAHN, 1976 y CUATRECASAS, 1974 ). El receptor de insulina solubilizado se une a la concanavalina A ligada a Sefarosa, lo que confirma su naturaleza glicoproteica deducida



de los experimentos indirectos ( CUATRECASAS y TELL, 1973 ).

Los restos de cisteína, tirosina y triptófano parecen jugar un papel importante en algunos receptores hormonales ya que se muestran susceptibles a la acción de reactivos capaces de reaccionar con estos grupos ( DÉFAU y col., 1974 y CUATRECASAS, 1971a ).

El peso molecular del receptor es de aproximadamente 200.000 dalton ( KAHN, 1976 ). Un dato muy interesante es que existen sugerencias experimentales de que estos receptores podrían estar formados por oligómeros más pequeños, lo que podría servir de base estructural a la interacción de los receptores entre sí y de fenómenos como la cooperatividad negativa observada en el receptor de insulina ( GINSBER y col., 1976 y KLEIN y col., 1973 ).

#### 7.- SISTEMA EFECTOR O CATALITICO.

La acción de las hormonas polipeptídicas tiene lugar a nivel de las membranas plasmáticas de las células diana, - y el proceso es bien conocido para aquellas hormonas que modulan la actividad de la adenilato ciclasa, enzima presente también en la membrana plasmática. La hormona es capaz de regular los niveles de AMPc en el interior de la célula que actuaría como segundo mensajero ( ROBINSON y col., 1968 ), y el AMPc - sería capaz de controlar determinados aspectos del metabolismo

celular ( JOST y RICKENBERG, 1971 ). Sin embargo, en el caso de aquellas hormonas que no son capaces de modular la actividad de la adenilato ciclasa, ni regular los niveles de AMPc en el interior de la célula, su sistema efector o sistemas - efectores, es desconocido, como ocurre con la insulina (CZECH 1977 ). Por esta razón todo lo que comentaremos sobre el sistema efector será sobre el sistema efector adenilato ciclasa.

La adenilato ciclasa es un enzima complejo presente en la membrana plasmática en los eucariotas y susceptible de regulación por diversos elementos, no solo las hormonas. El ión calcio a concentraciones elevadas es un inhibidor de la actividad adenilato cilasa, tanto la basal como la estimulada por las hormonas. Sin embargo, a concentraciones más bajas - puede ser incluso necesario para que las hormonas puedan estimularla.

El anión fluoruro estimula la actividad adenilato ciclasa de forma poco reversible. Sus características son diferentes del modo como la estimulan las hormonas, es independiente del medio lipídico en que se haya el enzima y su efecto se revierte con pirofosfato. Por otro lado, el anión fluoruro es capaz de inhibir la respuesta de la adenilato ciclasa a las hormonas y su mecanismo es diferente al de estimulación de la misma actividad ( BIRNBAUMER, 1977 ).

El sustrato de la adenilato ciclasa es el ATP complejo con magnesio (  $ATP Mg^{2-}$  ) y el ATP protonado (  $ATPH^{3-}$  ) - sería un potente inhibidor competitivo del enzima, a este hecho

se debe, en gran medida el efecto estimulador del magnesio ( De HAEN, 1974 ), con independencia de que pueda existir un sitio alostérico de regulación para el magnesio en algunos - sistemas ( GARBERS y JOHNSON, 1975 ).

El punto más interesante es la acción de los nucleótidos de guanina sobre la actividad de la adenilato ciclasa, ya que en la actualidad sabemos que son necesarios para que - las hormonas puedan ejercer sus efectos sobre el enzima. Los primeros en describir la acción de los nucleótidos de guanina sobre la adenilato ciclasa fueron y Rodbell y col ( RODBELL y col., 1971b) en membranas hepáticas. Estudios posteriores, indicaron que se hayan implicados de forma general en la regulación de la adenilato ciclasa. Normalmente lo que ocurre es que el GTP estimula la actividad de la adenilato ciclasa y - su estimulación por hormonas y el GDP la inhibe, sin embargo, esta regla no es rígida y son posibles otras modalidades - ( BIRNBAUMER, 1977 ). El GTP es capaz de estimular la actividad adenilato ciclasa solo ligeramente, pero lo hace de una - forma instantánea. Su análogo el guanidin imido difosfato - ( GMPPNHP ), que no se hidroliza, la estimula más fuertemente, sin embargo su acción requiere un cierto tiempo para manifestarse que se acorta cuando se eleva su concentración. Además su efecto es menos reversible que el de GTP.

Por otro lado, la hormona ( glucagón) por sí sola, en ausencia de EDTA y presencia de bajas concentraciones de - ATP estimula solo ligeramente la actividad adenilato ciclasa

y además requiere un cierto tiempo para que se manifieste su acción al igual que ocurre con el GMPPNHP. Cuando se utiliza GTP y glucagón juntos se estimula mucho más la actividad adenilato ciclase y de forma instantánea, sin retardo alguno. Si utilizamos GMPPNHP y glucagón juntos la estimulación de la adenilato ciclase es instantánea, pero solo un poco mayor que la producida por el GMPPNHP solo, de lo que parece deducirse que el nucleótido por sí solo, aunque de forma lenta, sería capaz de activar la adenilato ciclase de forma prácticamente máxima sin requerir la hormona. De todo ello parece deducirse que ambos activadores, la hormona y el GTP y sus derivados, son capaces de actuar de forma coordinada para llevar rápidamente al enzima a una conformación más activa. Ambos activadores se potencian (RODBELL y col., 1974, BIRNBAUMER, 1977). Estos hechos son la base más importante sobre la que se han elaborado diversas hipótesis sobre el modo como regulan los nucleótidos y las hormonas la acción de la adenilato ciclase. Estas hipótesis explican el comportamiento cinético de la adenilato ciclase de forma satisfactoria en el sistema utilizado por los autores, pero sin embargo a veces les es difícil explicar algunos hechos en otros sistemas (BIRNBAUMER, 1977).

Rodbell y col (RENDELL y col., 1975) propusieron la teoría de los tres estados. Según ellos serían posibles tres estados conformacionales para el enzima: E o básica de baja actividad catalítica, E', que es la forma complejada con GTP (OGMPPNHP) en principio con una alta potencialidad catalítica,

pero dado que es muy sensible a la inhibición por  $\text{ATPH}^{3-}$  su actividad catalítica es baja, e incluso inferior a la de E. De E' se pasaría a una forma E'' de alta actividad, poco sensible a  $\text{ATPH}^{3-}$ . El paso a la forma E'' es rápido si E' es la forma complejada con GTP y lento si lo es con GMPPNHP. Sin embargo, con GMPPNHP el equilibrio estaría mucho más desplazado hacia E''.

Cuatrecasas y col ( CUATRECASAS y col., 1975 ) propusieron otro modelo con bastantes similitudes al propuesto por el grupo de Rodbell. También serían tres los estados posibles para el enzima : el estado basal, poco activo, la forma complejada con el nucleótido, que tampoco sería plenamente activo y, por último, el enzima-PPi si el nucleótido con el que se une fuera el GTP y enzima-PNHP si fuera el GMPPNHP - el complejante. Este tercer estado es plenamente activo. Este modelo explica muy bien porqué el GMPPNHP estimula el enzima de forma poco reversible ya que el E-PNHP sería más difícil de hidrolizar que el E-PPi. Sin embargo este modelo no explica tan detalladamente el comportamiento cinético del enzima como lo hace el modelo de Rodbell.

Birnbaumer y col han propuesto un modelo para la acción de los nucleótidos y las hormonas sobre la adenilato ciclasa en el que solo existen dos estados del enzima ( BIRNBAUMER y col., 1980 e IYENGAR y col., 1980 ). Un primer estado - con actividad prácticamente nula y que predomina en ausencia de ligando y un estado activo predominante en presencia de li-

gando. Dicho modelo parece explicar también los datos cinéticos de la acción de adenilato ciclasa y su estímulo por nucleótidos y hormonas.

En los tres modelos propuestos los nucleótidos juegan un papel fundamental en la acción de las hormonas, y en ningún caso se postula la formación de un complejo estable entre el enzima y el complejo hormona-receptor. La función del complejo hormona-receptor sería la de favorecer el paso del enzima a la forma activa.

También se han propuesto otras hipótesis basadas en hechos más aislados con el fin fundamental de explicarlos - ( PFEUFFER y HELMREICH, 1975 ). Estos autores proponen que la activación de la adenilato ciclasa por los nucleótidos de guanina se debería a que provocarían la disociación de una subunidad inhibidora.

Debemos preguntarnos ahora como la hormona puede - favorecer el paso de la adenilato ciclasa a la forma más activa. Se han propuesto varias hipótesis, sin embargo, en todos los casos son muy escasas las evidencias de que ello pueda ocurrir de la forma propuesta.

El receptor sería una unidad catalítica de la adenilato ciclasa y al unirse a él la hormona se favorece la estabilización de la unidad catalítica en la conformación más activa. Sus únicas evidencias son el hecho de que la sensibilidad de las proteínas de la membrana a la iodada con lactoperoxi-

dasa es diferente en ausencia de glucagón o en su presencia - ( TROSPER y LEVY, 1974 ) y que la susceptibilidad de la adenilato ciclasa a la iodoacetamina varía con o sin glucagón - ( STORM y DOLGINOW, 1973 ). Pero en ambos casos es necesario emplear concentraciones muy elevadas de glucagón para observar dichos cambios.

Según otros autores el receptor sería una unidad inhibidora y la unión de la hormona a él liberaría de la misma a la unidad catalítica ( LEVEY y col., 1974 ). Esta misma hipótesis se ha formulado para otros activadores como el flurouro y los nucleótidos. Como evidencia de ello se ha sugerido que es la observación de que la aparición durante el desarrollo ontogénico de la sensibilidad a algunos estímulos mencionados se correlaciona con una disminución en la actividad basal del enzima. Sin embargo, el fenómeno parece ser bastante más complejo ( HUNZICKER-DUNN y BIRNBAUMER, 1976 ). Otros autores proponen ( NAJJAR y CONSTANTOPOULOS, 1973 ) que la forma activa - de la adenilato ciclasa sería el enzima defosforilado y que este resultaría inhibido al fosforilarse, por tanto, las hormonas favorecerían su defosforilación.

Otra posibilidad es el papel que podrían jugar los fosfolípidos en la transmisión de la información de la hormona a la adenilato ciclasa, aspecto del que hemos hablado al comentar la naturaleza del receptor.

La hipótesis del receptor móvil ( BENNET y col., 1975 ) sugiere que el receptor estaría separado de la unidad catalí-

tica y, al unirse a él la hormona, aumentaría su afinidad por ella. Como el receptor puede desplazarse a lo largo de la membrana, al chocar con la unidad catalítica el receptor unido a la hormona sería capaz de estabilizarla en una conformación más activa. Esta hipótesis es sumamente atractiva, dada su sencillez, y podría explicar fácilmente hechos difíciles de comprender, tal como lo son el que varios receptores actúen sobre la misma adenilato ciclase o que solo un porcentaje pequeño de ellos sea suficiente para activar totalmente el sistema. Sin embargo, este modelo se ha construido sobre los datos de activación de la adenilato ciclase por la toxina colérica (BENNET y CUATRECASAS, 1975a y BENNET y CUATRECASAS, 1975b ) y su apoyo experimental en el caso de la estimulación por las hormonas es muy escaso ( HOUSLAY y col., 1977 ).

Recientemente Rodbell ( RODBELL, 1980 ) ha propuesto que la adenilato ciclase es un sistema regulador complejo, que está constituido por el receptor, el componente catalítico y proteínas reguladas por GTP. En este complejo, el receptor inhibe la interacción de las proteínas reguladoras con GTP. La unión de la hormona al receptor, libera esta inhibición, lo que da lugar a una ruptura de la forma oligomérica en un complejo monomérico receptor-proteínas reguladoras. Bajo estas circunstancias este último complejo puede reaccionar con la unidad catalítica para dar lugar a la producción de AMPc.



## 8.- RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LA HORMONA.

El estudio de la relación estructura-actividad de las hormonas polipeptídicas se vé frenado por una serie de dificultades inherentes al mismo material de estudio. No es fácil determinar de forma detallada la estructura tridimensional de una proteína, ni obtener análogos o derivados con modificaciones estructurales conocidas y con las necesarias garantías de pureza, y precisamente son estos análogos uno de los instrumentos más fundamentales para estudiar las relaciones estructura-actividad. Al hallarse el receptor incluido en la membrana plasmática y dada la complejidad de esta, se hace muy difícil poder aplicar técnicas que rinden buenos resultados - con proteínas solubles.

El glucagón es un péptido pequeño de 29 aminoácidos y aunque su secuencia primaria es conocida desde 1957 (BROMER y col., 1957 ) no se han elucidado todavía sus relaciones estructura-actividad con la necesaria claridad. Posee dos zonas en sus partes extremas con un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos que son las zonas 22-27, cercana al C-terminal y la 6-14 cercana al N-terminal ( SASKI y col., 1975 ). La interacción de glucagón con su receptor presenta características de interacción hidrofóbica ( RODBELL y col., 1971a) y se pensó en un principio que la región hidrofóbica cercana al C-terminal era la que reconocía el receptor, siendo la zona N-terminal, en -

concreto la histidina N-terminal, la zona activadora de la adenilato ciclase. Así cuando se eliminan los restos hidrófobos de la zona C-terminal el fragmento resultante es inactivo ya que no se une al receptor. Sin embargo, cuando se elimina la histidina N-terminal el fragmento resultante se une al receptor con menor afinidad, pero es incapaz de activar la adenilato ciclase (RODBELL y col., 1970, SPIEGEL y BITENSKY, 1969, y RODBELL y col., 1971a). De ello parecía deducirse además que toda la molécula de glucagón era parte activa. Posteriormente se ha observado que los restos 28 y 29 de carácter no hidrofóbico juegan un papel importante en la unión al receptor (LIN y col., 1975) y que la zona hidrofóbica C-terminal no es tan esencial como se pensó en un principio. Además, el deshistidina glucagón es capaz de estimular la adenilato ciclase hasta un 70% de su actividad máxima, por tanto, no parece tan esencial como se pensó en un principio para activar la adenilato ciclase (LIN y col., 1975 y WRIGHT y col., 1978).

En solución, el glucagón es una molécula que posee poca estructura secundaria y terciaria. Sin embargo, cuando forma cristales sería una  $\alpha$ -hélice entre los restos 6 y 27 en la que los monómeros forman trímeros por interacción de sus zonas hidrofóbicas. Dichos trímeros pueden existir también en solución (BLUNDELL, 1979). Otros autores han observado estructura de cadena  $\beta$  en glucagón, pero solo a pH ácido (BEAVEN y col., 1969).

La interacción de glucagón con detergentes y fosfolípidos favorece la formación de la  $\alpha$ -hélice, ya que esta al exponer más al exterior los restos hidrófobos solo se formaría en condiciones capaces de estabilizarla ( BORNET y EDELHOCH, 1971 y EPAND y JONES, 1977 ). De todo ello se ha sugerido que la interacción de glucagón con su receptor por los restos hidrófobos C-terminales implicaría la estabilización de la  $\alpha$ -hélice lo que al conferir una estructura más rígida a la hormona dirigiría mejor la zona N-terminal para provocar mejor la acción biológica. Las interacciones hidrofóbicas de la hormona con el receptor serían más intensas que las implicadas en la formación de los trímeros, ya que es mayor la afinidad por el receptor que la formación de los trímeros ( BLUNDELL, 1979 ).

La insulina es una molécula más compleja que el glucagón. Consta de dos cadenas : la cadena A con 21 aminoácidos y un puente disulfuro intracatenario entre los residuos 6 y 11 y la cadena B con 30 aminoácidos. Ambas cadenas están unidas por sendos puentes disulfuro entre los residuos A7-B27 y A20-B19. Ha sido una molécula pionera en el estudio de su estructura y fue la primera proteína secuenciada ( RYLE y col., 1955 ).

A diferencia con el glucagón , en la insulina hay una clara correspondencia entre la unión al receptor y la actividad biológica, no conociéndose ningún antagonista (FREYCHET y col., 1971 y FREYCHET y col., 1974 ) con lo que parece

que sería la misma zona implicada en la unión la responsable de la activación. Por otro lado, no se conoce ningún análogo activo de la insulina que no posea una estructura terciaria muy similar a la de la misma, lo que sugiere que la estructura terciaria se requiere para mantener la actividad biológica ( BLUNDELL y col., 1972 ).

La reducción de los puentes disulfuro provoca una total inactivación de la hormona y parece ser que el puente disulfuro intracatenario es el menos crítico de todos.

Excepto el amino terminal de la cadena A, los restantes grupos amino no juegan un papel importante. Lo mismo ocurre con los grupos carboxilo ya que una esterificación de 2/3 de los mismos no reduce la actividad biológica de la hormona ( BLUNDELL y col., 1972 ).

La estructura de la insulina es globular, a pesar de ser una proteína pequeña y es capaz de formar dímeros y hexámeros en presencia de iones zinc. Su estructura está bien resuelta en cristales por difracción de rayos-X y en solución parece que sería muy similar y también puede formar dímeros y hexámeros.

La zona activa que reconoce al receptor estaría formada por los residuos hidrófobos B24, B25, B12, y en parte A19. En ella intervendrían también otros residuos no hidrófobos que interaccionarían iónicamente con el receptor y, que en opinión de algunos autores, estarían en una zona más periférica como

son los restos A1, A4, A21, B22 y B13 ( BLUNDELL, 1979a ).

#### 9.- MODIFICACIONES DE LA CONCENTRACION DE LOS RECEPTORES HORMONALES.

Al igual que ocurre con otras proteínas de la membrana, el receptor de las hormonas polipeptídicas está en un continuo proceso de síntesis y degradación ( SCHIMKE, 1975 ). Su concentración es, por tanto, en un momento determinado el producto de ambos procesos antagónicos. Al igual que en el caso de otras proteínas de la membrana ( SCHIMKE, 1975 ) estos procesos se pueden alterar originando un cambio en la concentración de receptor en la célula diana y, por tanto, un cambio en la sensibilidad de ella a la hormona.

Son diversos los factores que regulan estos procesos y entre ellos las hormonas juegan un papel fundamental y es a este punto al que nos vamos a referir.

Se ha demostrado, para diversas hormonas y en diferentes tejidos, tanto de animales de experimentación como humanos, una correlación inversa entre los niveles circulantes de la hormona y su número de receptores. Esto parece ser un mecanismo bastante generalizado y podría representar una forma de protección contra un exceso de hormona de la célula diana. Asimismo, una disminución en los niveles de hormona cir-

culante provocaría un aumento de su número de receptores con lo que se corregiría, al menos parcialmente, el defecto de hormona.

En el caso de la insulina, se ha demostrado una clara relación inversa entre el nivel de la hormona y su número de receptores. Este es el caso de ratones obesos, donde el número de receptores para insulina es menor en tejido hepático, adiposo, músculo cardíaco y timocitos (KAHN y col., 1973, SOLL y col., 1975, FREYCHET y col., 1972a, FREYCHET y FORGUE, 1974 y SOLL y col., 1974). El número de receptores en un 50-70% menor en los ratones obesos, pero son indistinguibles de los receptores de ratones no obesos, por lo que parece que solo hay alteración en su número y no en sus propiedades. El efecto de insulina sobre su propio receptor parece ser específico, ya que no hay alteración en la actividad 5'nucleotidasa, adenilato ciclasa y otros receptores como el de glucagón y el de hormona del crecimiento. Sin embargo, algunos autores han criticado estos resultados en base a que la unión de lectinas a membranas hepáticas es menor en los ratones obesos, lo que indicaría una alteración general en la composición de glicoproteínas de la membrana, sugiriendo que el cambio en el número de receptores para insulina no sería específico (CHANG y col., 1975a).

En cambio, en situaciones donde los niveles de insulina están disminuidos como son el ayuno y la diabetes me-

llitus el número de receptores para la insulina es mayor - ( HEPP y col., 1975, KASUGA y col., 1977 y DAVIDSON y KAPLAN, 1977 ). Sin embargo, ello no vá asociado necesariamente a una mayor sensibilidad de los tejidos a la insulina.

En humanos también se ha encontrado una relación inversa entre niveles de la hormona y unión de dicha insulina a monocitos. Así, en pacientes obesos resistentes a la acción de la insulina, el número de receptores para la misma en monocitos es menor, encontrándose elevados los niveles de la hormona. Esto explicaría la resistencia en estos pacientes a la acción de la insulina, tanto exógena como endógena ( ARCHER y col., 1975 y OLEFSKY y REAVEN, 1974 ).

El control de las concentraciones de receptores hormonales por la hormona homóloga ha sido demostrado para otras hormonas, tanto de naturaleza polipeptídica como no ( KAHN, - 1976 ).

El efecto es además directo ya que se puede demostrar que la incubación de monocitos humanos con insulina provoca - una disminución en la unión de insulina a los mismos debida a una disminución en el número de receptores que es dependiente del tiempo y de la concentración de insulina ( GAVIN III y col. 1974 y EASTMAN, 1977 ). Con una concentración de insulina  $10^{-9}M$  se provoca una disminución del 10% en la unión de la misma a las 24 horas, mientras que a  $10^{-7}M$  en 8 horas se obtiene una - reducción del 40%. Cuando se elimina la insulina del medio de

incubación se recupera la unión de la misma a su receptor, lo que se puede impedir si se añade cicloheximida al medio de incubación. Este efecto de la insulina se debe fundamentalmente a que aumenta la tasa de degradación del receptor, aunque este efecto es dependiente de la síntesis de proteínas, como lo demuestra el hecho de que la cicloheximida inhibe el efecto de la insulina. Por otra parte, cuando se utilizan distintos derivados de la insulina, su efecto es proporcional a su potencia biológica. También se ha demostrado el efecto de insulina "in vitro" en adipocitos y hepatocitos ( LIVINGSTON y col. 1978 y BLACKARD y col., 1978 ).

Utilizando fibroblastos cultivados que poseen receptores para insulina y hormona del crecimiento, se ha demostrado que esta última es capaz de disminuir sus receptores incluso a concentraciones tan pequeñas como  $10^{-10}$  M. Este efecto es debido a que se incrementa la tasa de degradación, aunque en este caso no es necesaria la síntesis de proteínas para que se manifieste el efecto de la hormona ( LESNIAK y ROTH, 1976 ). - Sin embargo, la insulina es incapaz de producir una alteración en los receptores de la hormona del crecimiento y esta no altera los receptores de la insulina.

El control de la concentración de receptores por la hormona homóloga también ha sido demostrado "in vitro" para otras hormonas ( KAHN, 1976 ). En algún caso, por el contrario, parece que el control por la hormona es lo inverso de lo descrito anteriormente, de tal forma que ella induciría la for-



mación de su propio receptor, y así niveles elevados de la hormona aumentan la población de su receptor. Este parece ser el caso de la prolactina ( POSNER y col., 1974 ).

No solo la hormona homóloga es capaz de jugar un papel importante en el control de sus propios receptores, sino también otras hormonas pueden desempeñar un papel importante.- En unos casos la hormona parece necesaria para mantener los receptores de la otra, como es el caso de los receptores lactogénicos de las células granulosas del ovario, para cuyo mantenimiento es necesaria la presencia de hormona folículo estimulante ( ZELEZNICK y col., 1974 y CHANNING, 1975 ). En otras situaciones, la acción de una determinada hormona estaría mediada, al menos en parte, por el efecto que tiene sobre los niveles de la hormona homóloga, como es el caso del efecto de los corticosteroides sobre la unión y efecto biológico de la insulina ( HARING y col., 1980 ). Asimismo, las hormonas tiroideas juegan un papel importante en el mantenimiento, en los tejidos diana, de la sensibilidad a otras hormonas, lo que en algunos casos, como el glucagón y las catecolaminas, el efecto parece estar mediado por una alteración en el número de sus receptores ( MADSEN y SONNE, 1976 y GIARALDI y MARINETTI, 1977 ). Sin embargo, el papel que juegan determinadas hormonas en el mantenimiento del receptor de otras es peor comprendido que aquel del control por la hormona homóloga y, por tanto, requiere un estudio más profundo y detallado.

Por otro lado, la alteración de la afinidad de la hor-

mona por el receptor podría también jugar un papel importante en el mantenimiento de la sensibilidad a la misma, aunque los datos que poseemos en la actualidad son contradictorios, desconociéndose qué mecanismos están implicados en la alteración de dicha afinidad ( KAHN y col., 1978 )

## O B J E T I V O S

A pesar de que las actividades de los componentes - receptor y efector del glucagón se modifican sensiblemente bajo diferentes situaciones experimentales que cursan con distintos grados de hiperglucagonemia, en la actualidad desconocemos si existe una relación directa entre la población de receptores para glucagón y los niveles circulantes de esta hormona. - Dado que los datos de que disponemos son sumamente contradictorios. Ello creemos es debido en gran parte a que los estudios fueron realizados " in vivo " y bajo estas circunstancias existen cambios metabólicos y hormonales importantes que pueden modificar las relaciones reales entre el glucagón y su receptor. El primer objetivo que nos propusimos estuvo encaminado hacia - la creación de un diseño experimental en el que estas posibles interferencias no estuvieran presentes. Para ello decidimos llevar a cabo de forma paralela experiencias "in vivo" e "in vitro", con el fin de elucidar si los efectos de glucagón sobre sus receptores son directos o están mediados por otras hormonas o metabolitos.

Nuestros estudios se centraron en los siguientes objetivos:

- Estudiar en ratas el efecto de una elevación crónica de los niveles circulantes de glucagón sobre la unión del mismo a sus receptores en hígado. Para ello inyectamos los animales cada 8 - horas durante 4 días con distintas cantidades de glucagón de acción prolongada. Al final de este período de tiempo se sacri-

ficaron los animales estudiandose en membranas hepáticas y hepatocitos las interacciones del glucagón con su receptor.

- Con el fin de estudiar si la alteración observada en la unión de glucagón a membranas hepáticas y hepatocitos de ratas hiperglucagonémicas fue debida a una modificación en las características de unión de la hormona al receptor o a un cambio en la capacidad total de sitios de unión o a ambos, estudiamos el proceso de asociación, disociación y unión de glucagón en el equilibrio y con diferentes concentraciones de hormona. También analizamos los procesos de degradación de la hormona y el receptor, con objeto de descartar si un cambio en estos procesos pudiese explicar los cambios observados. Especial atención se dedicó a la especificidad de los efectos de glucagón sobre su receptor y para ello estudiamos otras actividades presentes en la membrana en membranas hepáticas y hepatocitos de ratas controles e hiperglucagonémicas.

- Dado que cambios en las interacciones entre la hormona y el receptor puede que se expresen o no en modificaciones de la sensibilidad de la célula diana a la hormona, estudiamos en ambos grupos experimentales la actividad de la adenilato ciclasa y la producción de glucosa con o sin el estímulo del glucagón. También estudiamos el efecto de otros estímulos sobre las actividades señaladas con el fin de descartar una posible alteración de las mismas que enmascare el efecto de la alteración en la unión de la hormona al receptor.

- Las observaciones verificadas con el modelo "in vivo" fueron contrastadas "in vitro" en hepatocitos aislados y mantenidos en medio de cultivo durante 8 horas con el fin de separar los posibles efectos directos y no directos del glucagón. Tras la incubación de los hepatocitos en presencia o ausencia de glucagón se estudiaron las interacciones entre glucagón y su receptor así como el acúmulo de AMPc con diferentes concentraciones de hormona. También fueron analizados la unión de insulina a su receptor y el efecto de la adrenalina sobre la adenilato ciclasa.

- Aprovechando que la cicloheximida es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas, y utilizándola conjuntamente con glucagón en el sistema de células incubadas en medio de cultivo, obtuvimos información sobre el efecto de glucagón sobre la síntesis y degradación de su receptor.

M A T E R I A L   Y   M E T O D O S

## 1.- REACTIVOS

Glucagón e insulina monocomponente de cerdo, insulina monocomponente de rata y glucagón-Zn-protamina se obtuvieron de Novo Research Institute, Dinamarca. Antisero antiglucagón 30K, totalmente específico, fue donado por el Dr. R. Unger y el antisuero antiinsulina ( 607/9 ) fue donado por el Dr. P. Wright.

Na  $^{125}\text{I}$  ( 13-17 mCi/ $\mu\text{g}$  ), 2  $^3\text{H}$  Adenosina 5'-monofosfato ( 17 Ci/mmol ), 8  $^3\text{H}$  Adenosina 3'5'monofosfato cíclico ( 27 Ci/mmol ) y L U- $^{14}\text{C}$  Valina ( 285 mCi/mmol ) se adquirieron de The Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra.

Dextrano T-70 de Pharmacia Fine Chemicals, Suecia. Dietilaminoetil celulosa microgranular ( DE-52 ) y filtros de fibra de vidrio GF/C de Whatman Ltd., Inglaterra.

Filtros Nuflow de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, de Oxoid, Londres.

Medio de cultivo de células 199 de Gibco, Nueva York.

Los restantes productos orgánicos e inorgánicos - utilizados en este trabajo se obtuvieron de Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A. y de E. Merck, Darmstadt, Alemania.



## 2.- ANIMALES

Usamos ratas albinas Wistar de 150 g de peso para la obtención de membranas plasmáticas de hígado y de 200-250 g para la obtención de hepatocitos. Los animales se mantuvieron en condiciones estandar de luz, temperatura, humedad y alimentación, excepto antes de ser sacrificadas para lo que se mantuvieron 18 horas en ayunas. Aquellos animales de los que se obtuvieron hepatocitos para incubaciones en medio 199 durante períodos de tiempo prolongados, no se sometieron al período de ayuno previo. Los animales se manipularon siempre bajo anestesia con éter. Con objeto de obtener animales crónicamente hiperglucagomémicos, se les inyectó cada 8 horas distintas cantidades, 20, 40 y 60 µg, de glucagón-Zn-protamina ( G-Z-P ) por cada 100 g de peso corporal durante 4 días. Las ratas controles se inyectaron con una suspensión de Zinc - protamina.

## 3.- MARCAJE DE HORMONAS CON $^{125}\text{I}$ .

### 3.1.- Marcaje de insulina con $^{125}\text{I}$ .

El método utilizado se basa en el procedimiento descrito para marcar la hormona de crecimiento humana ( HUNTER y GREENWOD, 1962 ). La reacción implica una oxi-

dación del ioduro por un agente oxidante ( cloramina T ) y la fijación del iodo en la posición orto de los residuos - tirosina de la hormona. La reacción se para añadiendo un - reductor en exceso ( piro-sulfito sódico ). Las modificaciones del método original y que nosotros seguimos persiguen reducir los daños que pudiera sufrir la hormona en el proceso y consisten en la reducción del volumen de reacción y en utilizar cantidades equimoleculares de insulina y  $^{125}\text{I}$  ( FREYCHET y col., 1972 y FREYCHET, 1975 ).

#### Reactivos:

- Tampón fosfato 0,3 M, pH 7,5 :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro 3,56 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,75 g , completando con agua destilada hasta 1 litro.

- Solución de  $\text{Na } ^{125}\text{I}$  a una concentración de 5mCi/50  $\mu\text{l}$ .

-Cloramina T ( 2,5 mg /ml ) en tampón fosfato 0,3 M

- Piro-sulfito sódico ( 5 mg /ml ) pH 7,5

- Insulina monocomponente de cerdo ( 1 mg /ml ), disuelta - inicialmente en HCl 20 mM y completado el volumen con tampón fosfato. Esta solución se puede conservar algún tiempo congelada a  $-20^\circ\text{C}$ .

Las soluciones de cloramina T y piro-sulfito sódico se prepararon momentos antes de su utilización.

#### Método:

En el tubo de ensayo de añadieron sucesivamente :

- 5  $\mu$ l de insulina ( 5  $\mu$ g ), - 40  $\mu$ l de tampón fosfato pH 7,5, - 20  $\mu$ l de Na  $^{125}$ I ( 2 mCi ), - 5  $\mu$ l de cloramina T , se agitó durante 30 segundos y se paró la reacción añadiendo 5  $\mu$ l de piro sulfito sódico y 0,2 ml de tampón fosfato pH 7,5 conteniendo 2,5 % de albúmina bovina. De esta forma se logró una incorporación de radiactividad dentro de la fracción proteica del 65-85%.

Métodos para determinar la incorporación de  $^{125}$ I a la insulina:

1) Precipitación con ácido tricloroacético ( TCA ) 10% :

se tomaron 5  $\mu$ l de la mezcla de reacción que se diluyeron en 0,2 ml de tampón fosfato pH 7,5 y de aquí se tomaron muestras para determinar la incorporación de radiactividad en la proteína. A 5  $\mu$ l de muestra se le añadió 1 ml de tampón fosfato 1% albúmina y a continuación 1 ml de TCA 20%. La mezcla se centrifugó 5 min. a 3000 rpm en una centrífuga Beckman TJ-6RS, rotor TH-4 y el precipitado y sobrenadante se cuentan por separado. La radiactividad presente en el precipitado representa el  $^{125}$ I incorporado a la insulina.

2) Adsorción a talco : se basa en la propiedad del silicato de magnesio hidratado para adsorber la hormona intacta y no la degradada ni el iodo libre ( ROSSELIN Y COL.1966 ). 5  $\mu$ l de muestra se llevaron a 1 ml de tampón fosfato, a

los que se añadieron 50 mg de talco, y tras agitación se centrifugó ( después de 10 minutos en frío ) a 3000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Beckman modelo TJ-6RS, rotor TH-4. Sobrenadante y precipitado se contaron por separado.

Cálculo de la actividad específica :

$$\text{Actividad específica} = \frac{\% \text{ } ^{125}\text{I} \text{ incorporado} \times 2000 \text{ } \mu\text{Ci}}{100 \times 5 \text{ } \mu\text{g} \text{ de insulina}}$$

El tanto por ciento de  $^{125}\text{I}$  incorporado es la media de los porcentajes de radiactividad precipitable por TCA y por talco.

La actividad específica que se obtuvo fue de 250 - 400  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

### 3.2.- Purificación de mono $^{125}\text{I}$ -insulina

La separación se llevó a cabo por cromatografía en DEAE-celulosa a pH 9,5 ( FREYCHET y col., 1971a). A dicho pH la celulosa retiene las cargas negativas ya que los grupos dietilaminoetil están cargados positivamente. La elución se hizo con un gradiente continuo de NaCl ( 0-0,1 M ), - de esta forma eluyeron primero las sustancias menos cargadas negativamente y a continuación las más cargadas, es decir, la hormona eluyó en orden creciente de iodación.

## Reactivos :

- Tampón A : tris 0,05M, urea 7M, pH 9,5
- Tampón A con NaCl 0,1M
- Suspensión de DEAE celulosa activada en el tampón A.

## Activación de la DEAE-celulosa :

Se resuspendieron 15 g de DEAE celulosa en 100 ml de agua destilada a la que se añadió HCl hasta alcanzar un pH de 4. A continuación la celulosa se lavó con 100 ml de Tris 1M y posteriormente se resuspendió en el tampón A, después de lo cual la celulosa pudo ser utilizada. La DEAE celulosa se puede utilizar repetidamente, pero para ello es necesario lavarla cuidadosamente en la forma que a continuación indicamos ; a) se suspende en 100 ml de OHNa 0,2M y se mantiene bajo agitación durante 30 minutos, b) a continuación se filtra y la DEAE celulosa se suspende en 100 ml de HCL 0,2M y se mantiene bajo agitación durante otros 30 minutos, c) finalmente la DEAE celulosa se lava con Tris 1M.

## Método :

Con la DEAE celulosa activada se rellenó una columna de 0,9x30 cm sobre la que se depositó, con una pipeta Pasteur, la hormona marcada ( la mezcla de reacción ver 3.1).

Se eluyeron inicialmente unos 80 ml de tampón A, con lo que se eliminó la mayor parte del iodo no incorporado a la hormona; a continuación se aplicó un gradiente continuo de NaCl en tampón A de 0-0,1M. El gradiente que se aplicó se hizo - con un aparato tipo Varigrad con 9 cámaras que se llenan con 70 ml de tampón A con las siguientes concentraciones de NaCl: 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 y 0,1M.

Todo el proceso se realizó en cámara refrigerada a 4°C y la elución a una velocidad de 15 ml/hora. Las muestras ( 2 ml ), se tomaron en un colector de fracciones a partir - del momento en que se aplicó el gradiente. Algunos autores prefieren omitir la urea en todo el proceso (FREYCHET, 1975) ya que existiría el riesgo de alteración de la hormona por carbamilación a través de la formación de cianato, pero según nuestra experiencia, con ambas formas se obtienen - preparaciones de mono  $^{125}\text{I}$ -insulina con alta potencialidad inmunológica y biológica.

#### Eliminación de la urea por diálisis :

A las fracciones seleccionadas se les añadió 1 ml de Tris 0,05 M, NaCl 0,9%, pH 7,5, albúmina 1%, mezclándose a continuación todas las fracciones correspondientes a un pico y dializándose frente a 1 litro de Tris 0,05M, NaCl 0,9%, pH 7,5 dos veces durante 30 minutos a 4°C.

### Resultados :

Cuando se representó la radiactividad por 10  $\mu$ l frente al volumen de elución, se obtuvo un cromatograma como el que se representa en la Fig. 1, en el que aparecen tres picos. El 1° ( pico I ), que corresponde a la hormona degradada ( FREYCHET, 1974 ), un 2° pico ( pico II ), que corresponde a mono  $^{125}\text{I}$ -insulina y un 3<sup>er</sup> pico ( pico III ) formado por una fracción más heterogénea que contiene moléculas de insulina con más de un átomo de  $^{125}\text{I}$  y la mono  $^{125}\text{I}$  des-amino insulina que podría haberse formado durante el proceso ( FREYCHET, 1975 y FREYCHET y col., 1971 ).

### 3.3.- Marcaje de glucagón con $^{125}\text{I}$ .

El procedimiento es semejante al utilizado en el - marcaje de la insulina y solo haremos hincapié en las diferencias existentes entre ambos. El método seguido fue el de Nottey y col. ( NOTTEY y ROSSELIN, 1971 ).

### Reactivos :

- Cloramina T ( 5 mg /ml ), en tampón fosfato, pH 7,5
- Glucagón porcino monocomponente ( 1 mg /ml ).

### Método :

La diferencia más sobresaliente con respecto al

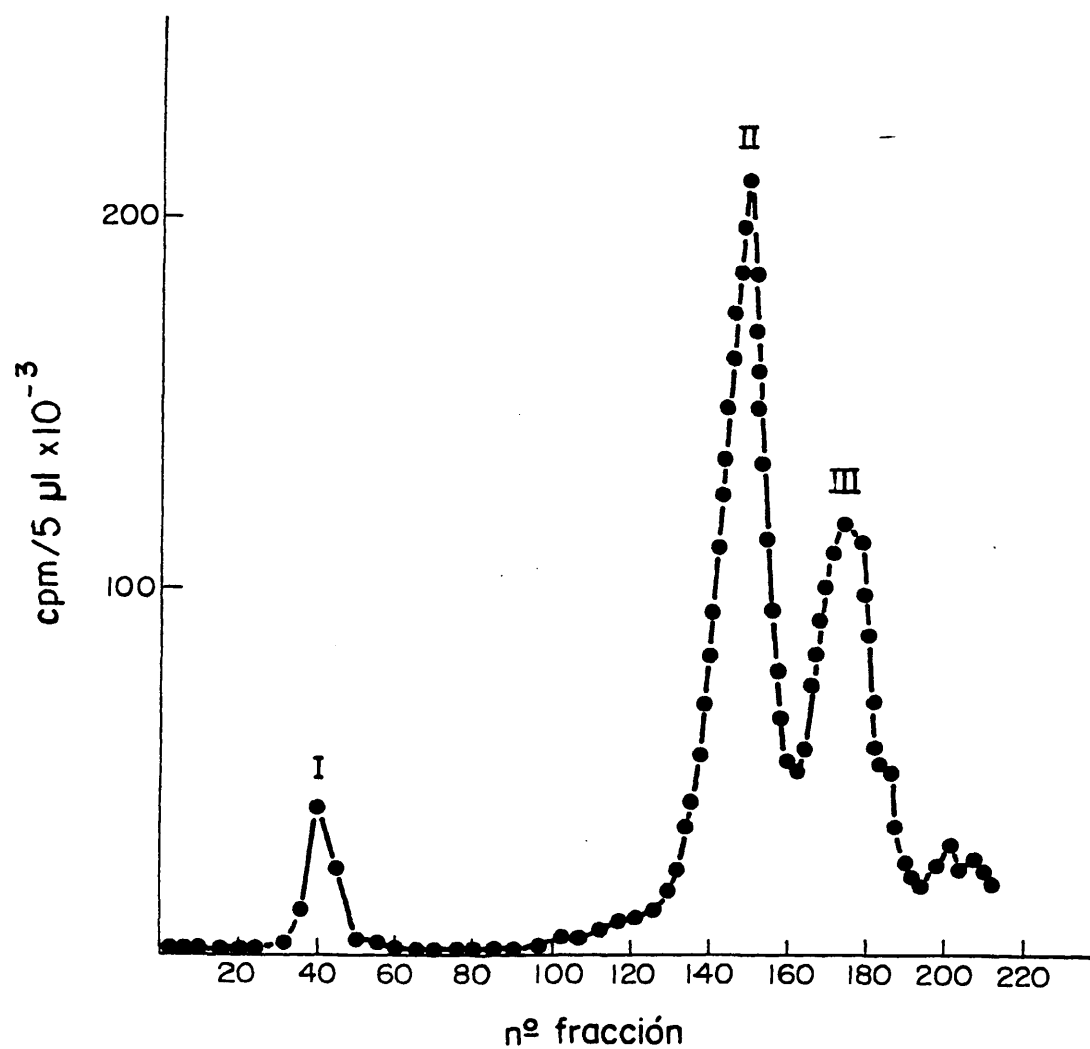


FIGURA 1.- PERFIL DE ELUCION DE LA MONO <sup>125</sup>I-INSULINA EN COLUM-  
NA DE DEAE CELULOSA.



marcaje de insulina es que se añadieron 25  $\mu$ l de solución de Na  $^{125}$ I, es decir, 2,5 mCi de  $^{125}$ I en vez de los 2 mCi que se utilizaron para marcar la insulina.

La incorporación de radiactividad a la hormona - que se logró fue del 75-90%, obteniéndose una actividad específica de 350-450  $\mu$ Ci/ $\mu$ g de glucagón.

#### 3.4.- Purificación de mono $^{125}$ I-glucagón

Por cromatografía en DEAE celulosa a pH 9,5.

Reactivos :

- Tampón A con NaCl 0,2M.

Método :

El gradiente continuo que se aplicó a la columna fue de 0-0,2M de NaCl y su volumen total de 200 ml que se distribuyeron en 5 cámaras de un aparato Varigrad, 40 ml en cada cámara con una concentración de NaCl de : 0, 0,05, 0,1, 0,15 y 0,2M.

El volumen de las muestras que se tomaron en el colector de fracciones fue de 1 ml.

Resultados :

Si se observa el cromatograma representado en la Fig.2, se observan de nuevo 3 picos : pico I, que es el -

1° en eluir y que corresponde a la hormona dañada en el proceso de marcaje, pico ~~II~~, es el mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón y es el - que se emplea en los experimentos de interacción hormona-receptor, pico ~~III~~ es el di  $^{125}\text{I}$ -glucagón.

#### 4.- OBTENCION DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE HIGADO DE RATA

El procedimiento que seguimos fue el descrito por Neville ( NEVILLE, 1968 ).

##### Reactivos :

- Solución hipotónica de bicarbonato sódico 1mM.
- Soluciones de sacarosa 69% y 42,3% ( P/V ), esta última - cuidadosamente ajustada con refractómetro y solución isotónica de sacarosa ( sacarosa 0,25M ).

##### Método :

Se emplearon animales de 150 g de peso que previamente se mantuvieron en ayuno 18 horas.

El proceso podemos dividirlo en las siguientes - etapas, recordando que todo ello debe hacerse a 4°C de temperatura :

- 1) En ratas anestesiadas con éter se practicó una incisión abdominal media. A continuación se cateterizó la vena porta prefundiéndose el hígado con 20 ml de sacarosa isotó-

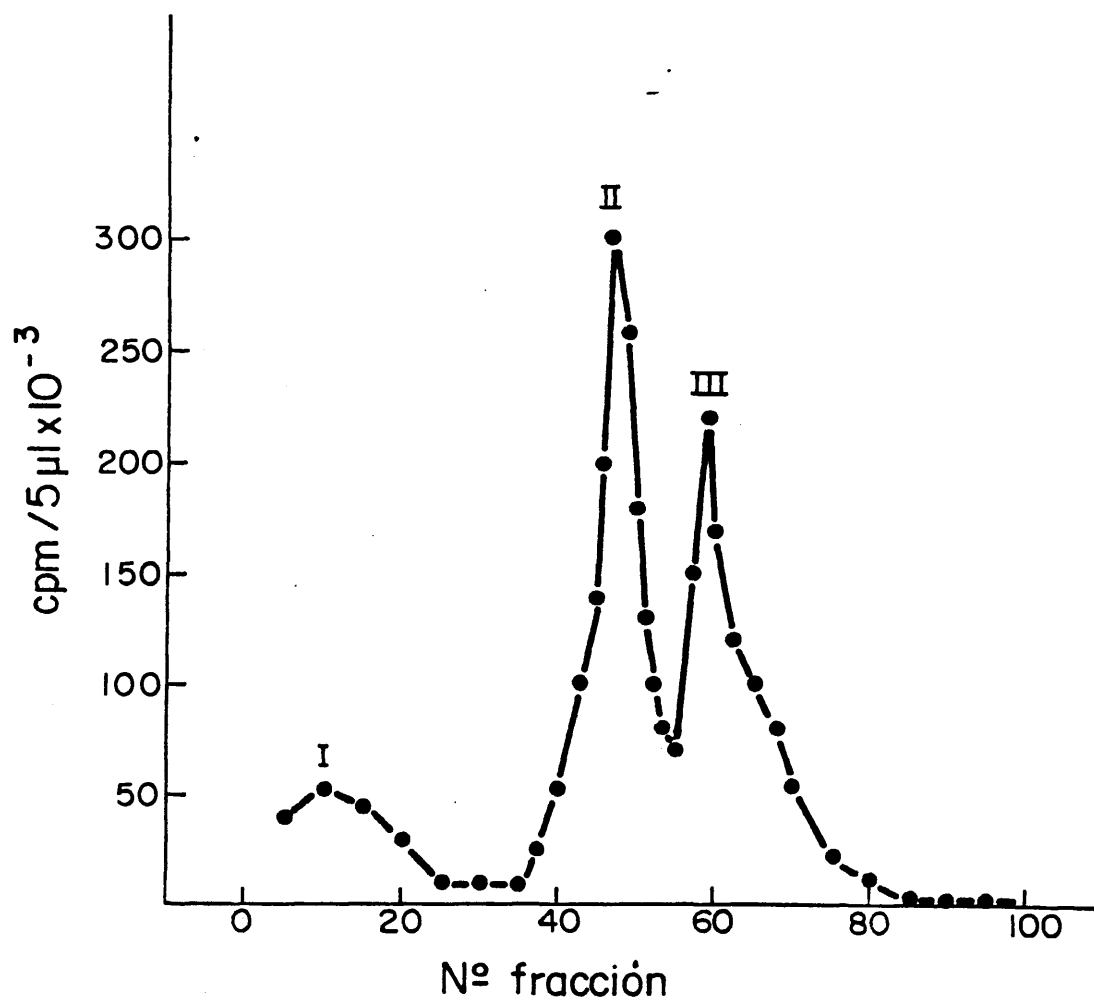


FIGURA 2.- PERFIL DE ELUCION DEL MONO  $^{125}\text{I}$ -GLUCAGON EN COLUMNA DE DEAE CELULOSA.

nica a 4°C, para lo cual fue necesario seccionar la vena cava inferior en el momento de iniciarse la perfusión.

2) Se liberó el hígado y se cortó finamente con unas tijeras. Cada 3 g. de hígado se homogenizaron en 20 ml de bicarbonato sódico 1mM en un homogeneizador de émbolo (Blaessig-Glass Rodiester, Nueva York, U.S.A. ), con 4 pasadas con émbolo ligero primero y otras 4 pasadas con émbolo ajustado después.

3) El homogenado se llevó a un volumen de 450 ml con bicarbonato sódico 1mM por cada 10 g. de tejido y se filtró primero a través de una gasa sencilla y luego a través de una gasa doble, tomándose una muestra para hacer las determinaciones necesarias.

4) El homogenado obtenido se centrifugó a 1500xg durante 30 minutos. El precipitado se recogió y resuspendió en bicarbonato sódico 1mM utilizando para ello el mismo homogeneizador con émbolo ajustado. Esta es la fracción 1500xg de la que se tomaron muestras para las diferentes determinaciones.

5) Se añadió un volumen igual de sacarosa 69% al volumen de la fracción 1500xg, ajustándose la concentración de sacarosa al 44% con ayuda de un refractómetro ( ABBE ). Se distribuyó la fracción 1500xg al 44% de sacarosa en tubos de ultracentrífuga depositándose cuidadosamente encima 10 ml de sacarosa al 42,3%. Las muestras se centrifugaron en una ul-

tracentrífuga ( Beckman L2-65B ) a 90.000xg en un rotor SW-27 durante 2 horas. Finalizada la centrifugación las membranas hepáticas formaron una película flotante sobre la sacarosa al 42,3%.

6) Las membranas obtenidas se resuspendieron en bicarbonato sódico 1mM con la ayuda de una jeringa de plástico de 5 ml y aguja n°22. La suspensión obtenida se centrifugó 10 minutos a 14.000 rpm en una centrífuga refrigerada ( Sorvall RC2-B, rotor SS-34 ). El precipitado que se obtuvo representó la fracción de membranas plasmáticas parcialmente purificadas, las cuales se resuspendieron en bicarbonato sódico - 1mM. Esta es la fracción que habitualmente utilizamos y las conservamos congeladas en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

##### 5.- OBTENCION DE HEPATOCITOS.

Los hepatocitos aislados de rata se obtuvieron por digestión del hígado "in situ" con una solución de colagenasa ( BERRY y FRIEND, 1969 y SEGLEN, 1975 ).

##### Reactivos :

- Tampón Krebs-Henseleit bicarbonato, pH 7,4 : NaCl 118mM , -  
NaCO<sub>3</sub>H 25mM, KCl 5mM, KPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 1,2mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2mM y CaCl<sub>2</sub> 2,5mM  
Antes de usarse se gaseó durante 20 minutos con carbógeno -

( 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> ).

- Solución A : tampón Krebs-Henseleit bicarbonato sin CaCl<sub>2</sub> ni MgSO<sub>4</sub> y con EDTA 0,25 mg /ml.
- Solución B : tampón Krebs-Henseleit bicarbonato sin MgSO<sub>4</sub> y con colagenasa ( 0,25 mg /ml ).

#### Procedimiento :

En ratas anestesiadas con éter se practicó una incisión abdominal media y se cateterizó la vena portahepática. Simultáneamente se seccionó la vena cava inferior por debajo de las venas renales. A través de la vena porta se perfundió el hígado con solución A a 37°C y bajo gaseo continuo con carbógeno. El flujo inicial de perfusión fue de 10 ml/min. que se elevó inmediatamente a 30 ml/min una vez comprobado que la solución circulaba adecuadamente a través del hígado. Una vez que se infundieron 130 ml de solución A se administraron otros 130 ml de solución B también a 37°C y gaseo continuo con carbógeno.

A continuación se liberó el hígado y se troceó finamente con unas tijeras en una placa de Petri con tampón Krebs-Henseleit a 4°C. La suspensión obtenida se agitó suavemente en un agitador magnético durante 2-3 minutos, al cabo de los cuales se filtró a través de una gasa doble. Mediante centrifugación ( 2 minutos a 50xg ) se separaron las células aisladas de los restos celulares. Este proceso se repitió

tres veces con objeto de aislar las células de otros componentes contaminantes.

El número de células aisladas por unidad de volumen se determinó con la ayuda de una cámara de Neubauer y la viabilidad celular por la exclusión con azul tripán al 0,2% en ausencia de albúmina. De esta forma se obtuvieron preparaciones celulares con una viabilidad del 75-80%. Las células aparecen bien preservadas cuando se observaron con el microscopio electrónico. (Fig 3.)

#### 6.- ESTUDIOS DE INTERACCION DE LA HORMONA CON MEMBRANAS HEPATICAS Y HEPATOCITOS.

La interacción entre la hormona y las membranas hepáticas se hizo en tampón Krebs-Ringer fosfato (FREYCHET y col., 1972 y BATAILLE y col., 1974) cuya composición fue: - NaCl 118mM, KCl 5mM,  $MgSO_4$  1,2mM,  $KPO_4H_2$  1,2mM y  $NaPO_4H$  10mM; pH 7,5 con 1% de albúmina. Las temperaturas empleadas fueron 10° y 20°C, fundamentalmente 20°C ya que por estudios previos sabemos que con esta temperatura se obtienen los mejores resultados.

La concentración de membranas fue de 0,1-0,15 mg de proteína/ml y la concentración de hormona  $^{125}I$  fue aproximadamente de  $10^{-10}M$  con distintas concentraciones de hormona no marcada hasta obtener la concentración deseada. Las -



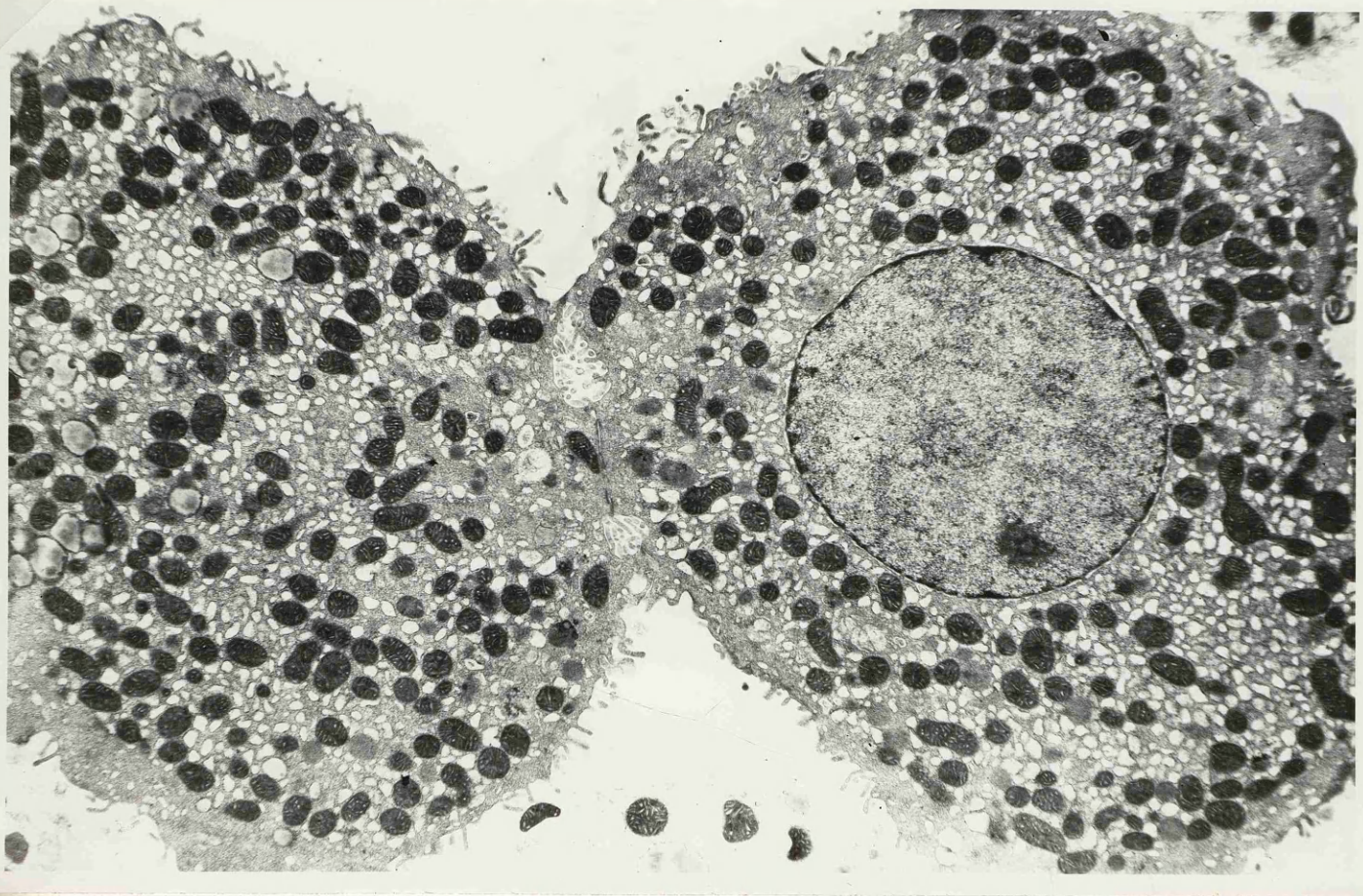


FIGURA 3.- FOTOGRAFIA TOMADA EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE  
HEPATOCITOS AISLADOS POR DIGESTION CON COLAGENASA.  
(x22000). Las preparaciones se hicieron siguiendo el  
método descrito por Lopez-Quijada (LOPEZ-QUIJADA y col., 1963).



muestras fueron de 0,2 ml.

Cuando los estudios se realizaron con hepatocitos empleamos el tampón Krebs-Ringer Henseleit con albúmina al 1%, pH 7,4, al que se le sustituyó el bicarbonato por Tris-HCl ( SONNE y col., 1978 ). La temperatura empleada fue de 20°C , siendo la concentración celular de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml. Todos los ensayos se realizaron en un volumen final de 0,5 ml.

#### 6.1.- Separación del complejo hormona-receptor de la hormona libre.

La separación de la hormona libre del complejo - hormona-receptor se llevó a cabo mediante microfiltración con membranas de filtración Nuflow con poros de 0,45  $\mu$ m de diámetro. La microfiltración de las muestras conteniendo membranas - o células se completó con la adición de 2 ml del tampón de incubación. Con objeto de reducir la unión inespecífica, los filtros se sumergieron en el tampón de incubación con albúmina bovina al 10%, al menos 1 hora antes de iniciarse la microfiltración.

La hormona- $^{125}\text{I}$  unida a su receptor no desplazable por altas concentraciones de la hormona no radiactiva ( $10^{-6}\text{M}$ ) es lo que denominamos unión inespecífica. Dicha unión inespecífica posee una afinidad muy baja y un número de sitios de -

unión infinito, y no está relacionada con la unión específica capaz de producir efectos biológicos y que posee una alta afinidad y un número finito de sitios. Dicha unión inespecífica es lo que se detecta en aquellos tejidos que no son blanco de la hormona.

#### 6.2.- Estudios de degradación de la hormona.

Son varios los métodos empleados para diferenciar la hormona intacta de la hormona degradada ( FREYCHET y col. 1972 ) y los resultados que se obtienen dependen de ellos. - El método más sensible es el que mide la capacidad de la hormona, previamente expuesta a la acción del sistema degradativo, de unirse de nuevo al receptor. Como fuente de receptor se emplearon las membranas plasmáticas de hígado. Paralelamente a la determinación de la cantidad de hormona degradada por este método, también hemos determinado su solubilidad en TCA al 10%, que es otra forma de determinar la degradación, aunque con un menor rango de sensibilidad.

La incubación de la hormona con las membranas o células, se hace tal como se describió anteriormente, a los tiempos indicados en el apartado de resultados. Finalizada la primera incubación, las muestras se centrifugaron en una microfuga B, Beckman, durante 2 minutos. Alícuotas de los sobrenadantes fueron incubadas por segunda vez con membranas hepáticas o fueron tratadas con TCA al 10%, con objeto de -

conocer el porcentaje de degradación durante la primera incubación. Se sabe que la hormona unida a su receptor se encuentra intacta, mientras que la libre presente en los sobrenadantes puede estar degradada o intacta.

#### 7.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA EN MEMBRANAS Y CELULAS HEPATICAS.

##### - Membranas hepáticas :

Las membranas se incubaron a 30°C durante 15 minutos en tampón Tris 20mM,  $MgCl_2$  5mM, teofilina 2,5mM, EDTA 1mM pH 7,5 ( ROSSELIN y FREYCHET, 1973), ATP 1,6mM, como sustrato de la reacción y un sistema regenerador de ATP compuesto por creatina quinasa ( 1 mg /ml ) y creatin fosfato ( 8 mg /ml ). La concentración de las membranas en la mezcla de reacción fue de 0,15-0,3 mg de proteína/ml y la incubación se realizó en ausencia o presencia de diversos estimulantes, como glucagón en concentraciones de  $5 \times 10^{-11}$  a  $10^{-6} M$  y NaF 20mM. El volumen de incubación fue de 0,2 ml a los que se añadieron 0,2 ml de TCA al 10%, a 4°C finalizada la incubación. Posteriormente los tubos de ensayo se conservaron a 4°C durante 20 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. A continuación se recogió el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido con TCA al 5% y centrifugado de nuevo. Los sobrenadantes pertenecientes a ambas centrifugaciones se mezclaron y fueron -

conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento en el que se determinaron las concentraciones de AMPc.

#### Hepatocitos :

Con objeto de determinar el acúmulo de AMPc en hepatocitos, estos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en tampón Krebs-Ringer bicarbonato, 4% albúmina, 2,5mM teofilina y en una atmósfera de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  ( 95%:5% ) ( JOHNSON y col., 1972 ), con agitación continua y a una concentración celular de  $2 \times 10^6$  celul./ml. Al cabo de 2 minutos 30 segundos se paró la reacción mediante la adición de TCA a una concentración final del 5% - centrifugándose las muestras a 3000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada, después de una incubación de 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al igual que con las membranas hepáticas el precipitado se resuspendió con TCA al 5%, centrifugándose de nuevo después de los 20 minutos de incubación. Ambos sobrenadantes se mezclaron y conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento en que se determinaron las concentraciones de AMPc.

Antes de determinar el AMPc es necesario eliminar el TCA de las muestras, lo que se hace lavando estas 4 veces con un volumen doble de éter etílico saturado de agua. Los restos de éter etílico que quedan se eliminan calentando las muestras a  $90^{\circ}\text{C}$  durante 4 minutos. De la misma forma se procesa también el estandar de AMPc que se empleará para construir la curva estandar en el radioinmunoensayo.

## 8.- METODOS ANALITICOS

### 8.1.- Determinación de insulina

La determinación de insulina, al igual que la de glucagón, se realizó por radioinmunoensayo ( YALLOW y BERSON, 1960 ). Este procedimiento se basa en la competencia de la hormona marcada con  $^{125}\text{I}$  y la no radiactiva presente en las muestras problema o en los distintos puntos de la curva estándar frente a un anticuerpo específico contra la misma.

#### Reactivos:

- Tampón A: Glicocola 0,2M, 0,25% albúmina y 1% de suero bovino pH 8,8.
- Solución de insulina  $^{125}\text{I}$  : 83 pg de  $^{125}\text{I}$ -insulina/ml en tampón A.
- Soluciones estándar de insulina en tampón A, que se prepararon por dilución a partir de una solución inicial de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina cuya concentración se ajustó por espectrofotometría ( POTER, 1953 ). La insulina empleada fue la de rata y no la de cerdo, usualmente empleada en humanos y otros animales de experimentación, dado que las peculiaridades de la rata ( 2 insulinas y 2 proinsulinas ) le confieren propiedades antigénicas diferenciales que se manifiestan fundamentalmente cuando en las curvas estándar no se emplea la hormona homóloga.

- Solución de suero antiinsulina 1: 50.000 en tampón A.

Procedimiento :

En el tubo de ensayo se añadieron :

- 0,6 ml de solución de insulina-<sup>125</sup>I
- 0,2 ml de estandar o muestra.
- 0,2 ml de solución de suero antiinsulina., excepto - los blancos que no llevan anticuerpo y este se sustituye por 0,2 ml de tampón A.

Se incubó a 4°C durante 2 días al cabo de los cuales se separó la hormona libre de la hormona unida al anticuerpo por adsorción de la primera a carbón activado ( HERBERT y col., 1965 ).

Recogida :

Suspensión de carbón : carbón activado 3%, dextrano T-70 0,25% en tampón 0,2M de glicocola pH 8,8 agitada durante al menos 20 minutos antes de usarse.. Si las muestras donde se hace la determinación hormonal es plasma, se añaden 0,2 ml de suero bovino a los tubos de la curva estandar antes de añadir la suspensión de carbón, con el fin de que la concentración de proteínas sea igual en todos los tubos. A continuación se añadieron 0,5 ml de la suspensión de carbón - dextrano a cada tubo. Tras una incubación a 4°C durante 45 - minutos, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm 10 minutos. -

La radiactividad se determinó en el precipitado.

El tanto por ciento de hormona unida es :

$$\frac{\text{cpm blanco} - \text{cpm muestra o estandar}}{\text{cpm blanco}} \times 100$$

## 8.2.- Determinación de glucagón.

El fundamento es el mismo que para la determinación de insulina y la metodología muy similar, de tal forma que solo haremos hincapié en aquellos aspectos diferenciadores.

La obtención de sueros antiglucagón específicos ha planteado muchos más problemas que en el caso de la insulina. En nuestro caso empleamos un suero antiglucagón totalmente específico y ampliamente utilizado. Este suero 30K fue generosamente donado por el Dr. R.H. Unger ( UNGER y col., 1959).

### Reactivos :

- Tampón A. El mismo empleado en las determinaciones de insulina.
- Solución de glucagón-<sup>125</sup>I : 30 pg/ml en tampón A.
- Solución de trasylol : 10.000 KIU/ml ( concentración en unidades en función de su capacidad de inhibir la actividad de la kalikreína ). El trasylol se emplea para inhi-

bir la degradación del glucagón, hormona muy labil a la -  
acción de las peptidasas ( EISENTRAUT y col., 1968 ).

- Soluciones estandar de glucagón preparadas a partir de una  
solución de 20  $\mu\text{g}$  /ml, ajustada por espectrofotometría -  
(
- Solución diluída 1: 36.000 de suero antiglucagón 30K.

#### Procedimiento :

Se mezclaron en el tubo de ensayo :

- 0,5 ml de glucagón- $^{125}\text{I}$
- 0,1 ml de Trasylol
- 0,2 ml de estandar o muestra
- 0,4 ml de suero antiglucagón, excepto en los blancos  
que contenían 0,4 ml de tampón A.

Esta mezcla se incubó 4 días a 4°C, al cabo de los  
cuales se añadió 0,5 ml de la suspensión carbón-dextrano '-  
( 0,5 % carbón activado y 0,25% de dextrano T-70 en tampón  
0,2M de glicocola pH 8,8 ).

#### 8.3.- Determinación de AMPc.

La determinación de AMPc se realizó por inmunoen-  
sayo ( STEINER y col., 1969 ), con un anticuerpo específi-  
co para AMPc.



### Reactivos

- Tampón A : tampón de fosfato monosódico 0,1 M, NaCl 0,9% pH 7,0.
- Antisuero anti AMPc : este antisuero se diluyó 800 veces en tampón A con 0,3% de globulina bovina.
- Solución de  $^3\text{H}$ -AMPc (27 Ci/mmol) conteniendo 7000-9000 cpm/0,1 ml en tampón A.
- Solución estandar de AMPc : ajustada por espectrofotometría ( $\epsilon$  -14650 para  $\lambda$ =250 nm)

### Procedimiento:

La mezcla de incubación contenía en 0,3 ml : 0,1ml de muestra problema o estandar, 0,1 ml de  $^3\text{H}$ -AMPc y 0,1 ml de suero anti AMPc (dilución 1:800) o bien 0,1 ml de tampón A conteniendo 0,3% de  $\gamma$ -globulinas.

Esta mezcla se incubó durante 18-20 horas a 4°C y al cabo de este tiempo se añadió a cada tubo 1,7 ml de solución de sulfato amónico al 40%. El precipitado resultante se obtuvo por centrifugación a 4°C durante 30 min. a 3000 rpm. en una centrífuga Beckman TJ-6RS, rotor TH-4, el cual se solubilizó con 1 ml de OHNa 0,01 N y se mezcló con 5 ml de líquido de centelleo (tolueno-tritón, 2:1, PPO 4 g , POPOP 0,2 g ). Con la radiactividad determinada en un contador para radiaciones  $\beta$  se construyó una curva estandar en función del log. del % unido frente a la concentración de AMPc, sobre la que se calcularon los valores

de las muestras problema.

#### -8.4.- Determinación de proteínas.

Se basa en la reducción del reactivo de fenol de Folin por las proteínas previamente tratadas con sulfato de cobre en medio alcalino según el procedimiento de Lowry y col ( LOWRY y col., 1951 ).

##### Reactivos:

- Solución A:  $\text{OHNa}$  0,1 N,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% (0,18 N)
- Solución B: Tartrato de sodio y potasio al 1% y  $\text{CuSO}_4$  pentahidratado al 0,5% (se preparó en el momento de hacer la determinación)
- Solución C: 50 volúmenes de A y 1 volumen de B.
- Solución E: Reactivo Folin-Ciocalteu (O.FOLIN y V.CIOCALTEU, 1927).

##### Procedimiento:

Se añadieron 3 ml de reactivo C a las muestras problema o estandar (0-100  $\mu\text{g}$  de albúmina bovina en un volumen de 0-100  $\mu\text{l}$ ) y se dejó transcurrir la reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos, al cabo de los cuales se añadieron 0,1 ml del reactivo E que se mezcló bien con los otros componentes. Después de 20 minutos se leyó la absorbancia, a una longitud de onda de 500 nm, en un espectrofotómetro Bausch-Lomb Spectronic 710.

### 8.5.- Determinación de la actividad 5' nucleotidasa

La 5' nucleotidasa cataliza la hidrólisis del 5'AMP hasta adenosina y fósforo. Dado que esta enzima se localiza en la membrana plasmática de la célula, su actividad se ha determinado frecuentemente para evaluar el índice de pureza para membranas plasmáticas de hígado ( NEVILLE, Jr., 1975 ). Para su ensayo seguimos el procedimiento descrito por Avruch y col. (AVRUCH y col., 1971).

#### Reactivos:

- Tampón A: Tris 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,2 mM, 5'AMP 0,2 mM y  $^3\text{H}$ -5'AMP en cantidades trazadoras, pH 7,8.
- Solución de  $(\text{OH})_2\text{Ba}$  0,25 M
- Solución de  $\text{ZnSO}_4$  0,25 M.
- Solución de centelleo Tolueno-Tritón X-100 : Tolueno-Tritón X-100 en proporción de 2:1 en volumen con 4 g /l de PPO y 0,2 g /l de POPOP.

#### Procedimiento:

Se añadieron 10-30  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen de 10  $\mu\text{l}$  a 1 ml de tampón A, excepto en el blanco. Las muestras se incubaron a 30°C durante 15 minutos, al cabo de los cuales se paró la reacción por la adición de 0,2 ml de solución de sulfato de zinc. La proteína y el 5'AMP no hidrolizado se pre-

cipitaron por la adición de 0,2 ml de solución de hidróxido -  
bárico, mientras que la adenosina permanece en el sobrenadante.  
Tras centrifugación durante 10 min. a 3000 rpm se tomaron  
0,5 ml del sobrenadante que se contaron con una solución de -  
centelleo de Tolueno-Tritón X-100.

Los resultados se expresaron en  $\mu$ moles de 5'AMP hi-  
drolizados por mg. de proteína y por hora :

$$\begin{aligned} \frac{\mu\text{moles 5'AMP hidrolizados/}}{\text{mg /hora}} &= \frac{\text{cpm muestra-blanco}}{\text{cpm totales-blanco}} \times 0,2 \times \\ &1/\text{mg proteína} \times 1/\text{hora.} \end{aligned}$$

#### 8.6.- Determinación de glucosa

Las muestras se desproteinizaron con 0,5 volúmenes -  
de  $\text{ZnSO}_4$  2% y 0,5 volúmenes de  $(\text{OH})_2\text{Ba}$  1,8%. Tras centrifuga-  
ción a 3000 rpm durante 10 minutos, la glucosa se determinó en  
alícuotas del sobrenadante por el método de la glucosa ox.dasa  
( HUGGET y NIXON , 1957 ).

## R E S U L T A D O S

## 1.- ESTUDIOS CON MEMBRANAS PLASMATICAS DE HIGADO DE RATA

### 1.1.- Proceso de purificación de las membranas plasmáticas de hígado.

#### 1.1.1.- Índices de pureza: actividad 5'nucleotidasa y - unión de mono <sup>125</sup>I-glucagón.

En la Tabla 1. se presentan conjuntamente la cantidad de proteína por cada 10 g de hígado y la actividad 5'nucleotidasa en umoles de 5'AMP hidrolizados por mg. de proteína y por hora en cada una de las fracciones que previamente se han descrito en el proceso de purificación de membranas hepáticas. Se puede observar que la cantidad de proteína por cada 10 g de hígado fue de 2 g en el homogenado, tanto en animales controles como tratados con G-Z-P, y que la cantidad de proteína obtenida en la fracción de membranas parcialmente purificadas a partir de esos 10 g de hígado osciló entre 10,2-14 mg. en los diferentes grupos de animales.

En los distintos grupos la actividad 5'nucleotidasa de los homogenados fue de 1,5-1,8  $\mu$ moles de 5'AMP hidrolizados por mgr. de proteína y por hora y de 12-17  $\mu$ moles en la fracción de membranas parcialmente purificadas. Si analizamos los índices de actividad 5'nucleotidasa de las distintas fracciones referidos a la actividad en el homogenado que consideramos como 1, po-

dremos verificar que, en todos los grupos, los índices de purificación fueron semejantes. Estos índices nos indican que las membranas hepáticas se purificaron 9 veces sobre la preparación inicial y que el grado de pureza fue semejante para todos los grupos.

Asimismo como índice de purificación utilizamos la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón a las distintas fracciones obtenidas durante el proceso de aislamiento de las membranas hepáticas. Las distintas fracciones ( 0,6 mg./ml ) se incubaron con tampón KRP pH 7,5 + Albúmina 1% y mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón (  $0,7 \times 10^{-10} \text{ M}$  ) durante 20 minutos a  $30^\circ\text{C}$ . Los resultados obtenidos con este procedimiento los representamos en la Tabla 2. en fmoles de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón unidos por mg. de proteína, observándose que la unión fue menor en ratas tratadas con G-Z-P que en ratas controles y, que esta disminución fue inversamente proporcional a la dosis de G-Z-P empleada. Estas diferencias fueron observables incluso en el homogenado, a pesar de la pequeña cantidad de hormona unida específicamente por mg. de proteína en esta fracción ( 2,4 fmoles/mg. de proteína en ratas - controles), manteniéndose esta reducida unión hormonal en las restantes fracciones. De esta forma, la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón fue de 62, 47,6, 36,2 y 22,7 fmoles/mg. de proteína en membranas parcialmente purificadas de ratas controles y tratadas con G-Z-P ( 20, 40 y 60  $\mu\text{g.}/100 \text{ g.}$  de peso ) respectivamente.

TABLA 1.- COMPARACION DEL PROCESO DE PURIFICACION DE MEMBRANAS HEPATICAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON GLUCAGON.

MEDIA ERROR ESTANDAR. N=10.

Purificación	Proteína total ( mg )			5' nucleotidasa(µmoles 5'AMP hdrol./mg/hora)			Actividad específica relativ					
	C	T-20	T-40	T-60	C	T-20	T-40	T-60	C	T-20	T-40	T-60
Homogenado	2011±72	2200±260	2040±115	1943±107	1,5±0,3	1,8±0,3	1,6±0,3	1,5±0,3	1	1	1	1
1 <sup>er</sup> sedi- mento.	240±23	220±21	250±27	225±23	3,9±0,5	4,0±0,4	4,0±0,5	3,8±0,5	2,6	2.2	2,5	2,
Membranas parcialmente purificadas	14±2	10±1	12±1	13±2	14,2±1,8	17±2	14,5±1	12±1,7	9,5	9,4	9,1	8,

El total de proteína se expresa en mg por 10 g de hígado ( de peso húmedo ).

C: rata control; T-20, 40 o 60 : ratas tratadas con 20, 40 o 60 µg . de G-Z-P/100 g de peso. cada 8 horas.



TABLA 2.-

UNION DE MONO  $^{125}\text{I}$ -GLUCAGON A LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL PROCESO DE PURIFICACION DE MEMBRANAS HEPATICAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON GLUCAGON. MEDIA  $\pm$  ERROR ESTANDAR N=10.

Purificación	Glucagón unido(fmoles/mg de prot)			
	C	T-20	T-40	T-60
Homogenado	$2,4 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,4$	N.D.	N.D.
1 <sup>er</sup> sedimento	$16,2 \pm 1,7$	$9,0 \pm 0,9$	$8,0 \pm 1,1$	$4,8 \pm 0,8$
Membranas parcialmente purificadas	$62,0 \pm 4,1$	$47,6 \pm 4,2$	$36,2 \pm 4$	$22,7 \pm 2,4$

C: ratas controles, T-20, 40 o 60: ratas tratadas con 20, 40 o 60  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g . de peso. N.D.: no detectado.

### 1.2.1.- Asociación y disociación de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón.

La asociación de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagon(  $0,7 \times 10^{-10} \text{M}$  ) a membranas hepáticas en función del tiempo de incubación ha sido representada en la Figura 4. en porcentajes de la cantidad máxima de glucagón unida. Tanto las membranas de ratas controles como las pertenecientes a ratas tratadas con  $40 \mu\text{g}$  de G-Z-P/  $100 \text{ g}$  de peso, mostraron a  $10^\circ$  o  $20^\circ\text{C}$  un patrón semejante de asociación. Por otra parte, el incremento de la temperatura - aumentó la unión de la hormona a su receptor. En efecto, la - unión máxima de glucagón se consiguió a las 4hr. o 3hr. cuando las temperaturas de incubación fueron  $10^\circ$  o  $20^\circ\text{C}$ , respectivamente, mientras que a estas mismas temperaturas, el 50% de la unión máxima se obtuvo a la hora o 20 minutos.

La disociación del mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón previamente - unido a las membranas se llevó a cabo a  $10^\circ$  o  $20^\circ\text{C}$ , diluyéndolas 100 veces con KRP + Albúmina al 1%, pH 7,5., o tratándolas con glucagón no radiactivo (  $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$  ), después de 90 minutos de asociación a  $20^\circ\text{C}$ . El grado de disociación del mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón en ambos grupos de membranas fue semejante, tanto por dilución como por dilución más la adición de glucagón no radiactivo. Como consecuencia de ello en la Figura 5 presentamos solo los resultados obtenidos por dilución en forma de tanto por - ciento unido respecto a lo que estaba unido en el momento de la dilución. Como puede observarse, el proceso de disociación es igual para membranas controles que para aquellas procedentes de

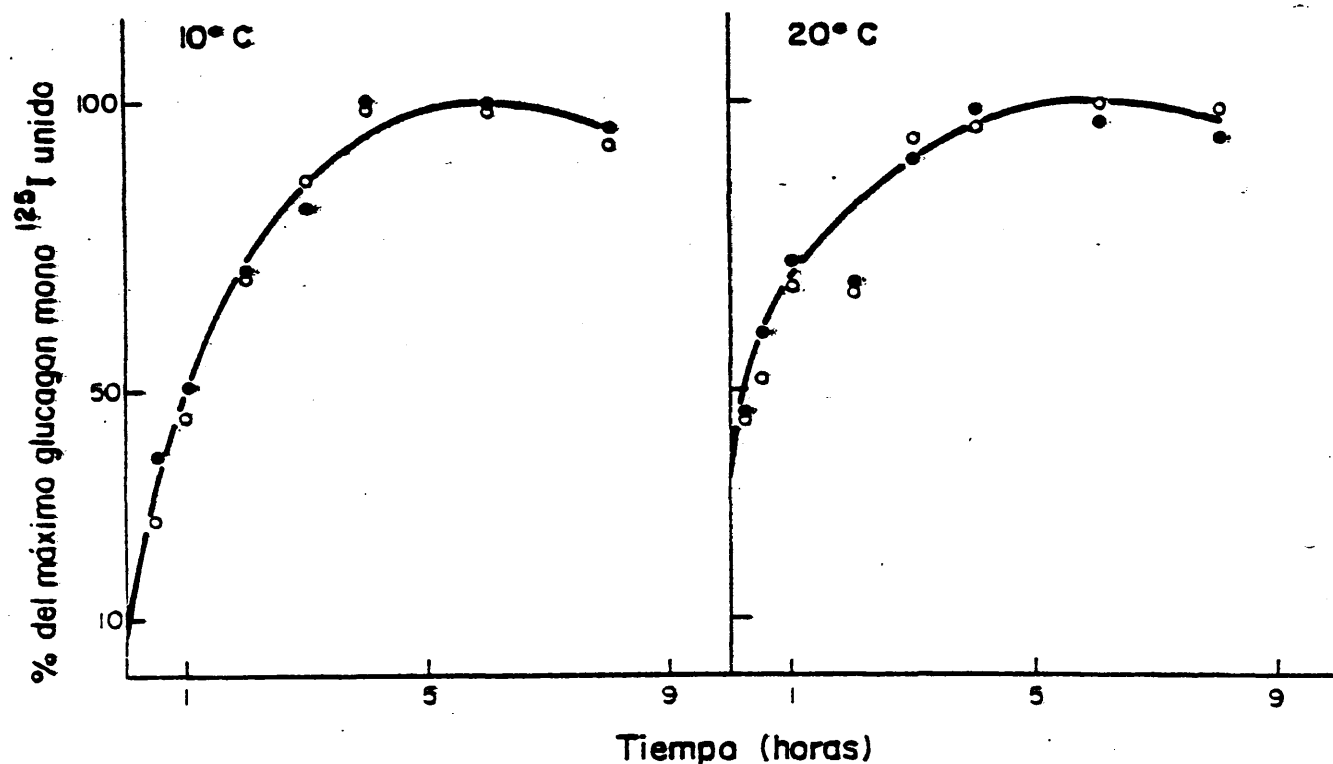


FIGURA 4.- ASOCIACION DE MONO  $^{125}\text{I}$ -GLUCAGON A MEMBRANAS HEPATICAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON  $40\text{ }\mu\text{g}$  DE G-Z-P/100 G. DE PESO. Las membranas,  $0,12\text{ mg}$  de protefna/ml en controles (●-●) y  $0,1\text{ mg/ml}$  en tratadas con  $40\text{ }\mu\text{g}$  de G-Z-P (○-○), se incubaron en KRP albúmina al 1%, pH 7,5 con mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón ( $0,7 \times 10^{-10}\text{ M}$ ) a  $10^\circ$  y  $20^\circ\text{C}$ . A los tiempos indicados, se determinó la unión específica y se representó como el porcentaje de la cantidad máxima unida. Cada punto representa la media de 3 experimentos diferentes por duplicado.

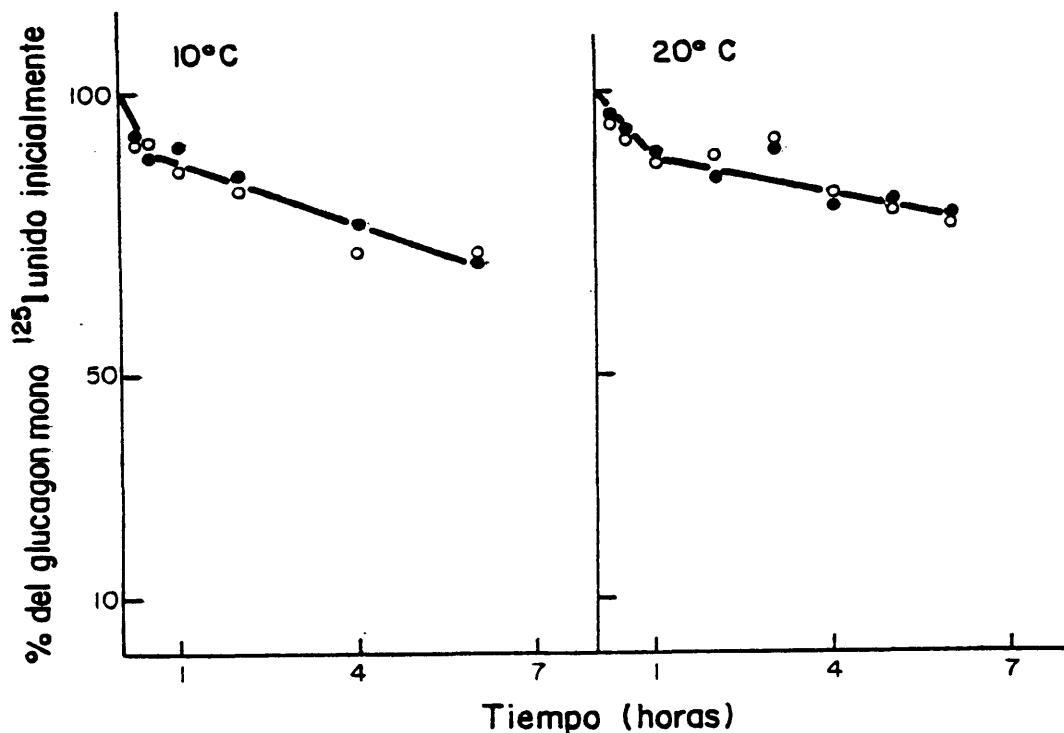


FIGURA 5.- DISOCIACION DE MONO  $^{125}\text{I}$ -GLUCAGON PREVIAMENTE UNIDO A MEMBRANAS HEPATICAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 40  $\mu\text{g}$  DE G-Z-P/100 G. DE PESO. Membranas plasmáticas de ratas controles ( ●—● ) y tratadas con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P ( ○—○ ) fueron incubadas durante 90 min. a 20°C en KRP, albúmina al 1%, pH 7,5 y mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón. Al finalizar dicho período de tiempo, - 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla de incubación fueron diluidos con 5 ml. del mismo tampón y la incubación se continuó a 20° y 10°C durante los tiempos indicados, al cabo de los cuales se determinó la radiactividad unida específicamente a las membranas. Cada punto es la media de 3 experimentos por duplicado.

ratas tratadas con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g de peso, y en -  
nuestras condiciones de ensayo es baja tanto a 20°C como a 10°C.  
A 20°C se necesitó 1 hora de incubación para lograr un 15% de  
disociación.

### 1.2.2.- Degradación de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón y su receptor.

La cantidad de hormona degradada durante los períodos  
de incubación se determinó por su capacidad de unirse de nuevo  
a membranas hepáticas de rata o su solubilidad en TCA al 10%, de  
acuerdo con lo descrito en Material y Métodos. Como puede obser-  
varse en la Fig. 6, la degradación de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón por -  
membranas plasmáticas de hígado es un proceso muy rápido, depen-  
diente de la temperatura. Después de una hora y media de incu-  
bación el 50% del mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón inicial fue degradado, -  
mientras que a 10°C se necesitaron 3 horas para lograr ese 50%  
de hormona inactivada. El patrón degradativo fue igual para las  
membranas procedentes de ratas controles y para aquellas de -  
animales tratados con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g de peso. El -  
porcentaje de hormona inactivada presentado en la Fig. 6 se re-  
fiere a la capacidad de la hormona de unirse de nuevo al recep-  
tor, ya que si fuera relacionado a la radiactividad soluble en  
TCA al 10% ( resultados que no se presentan ) observaríamos -  
que los niveles de hormona degradada son mucho menores, 25% y  
50% a las 4 horas a 10° y 20°C, respectivamente. No obstante con  
ambos procedimientos el grado de degradación fue semejante con  
las membranas de ratas controles o tratadas con 40  $\mu\text{g}$  de -

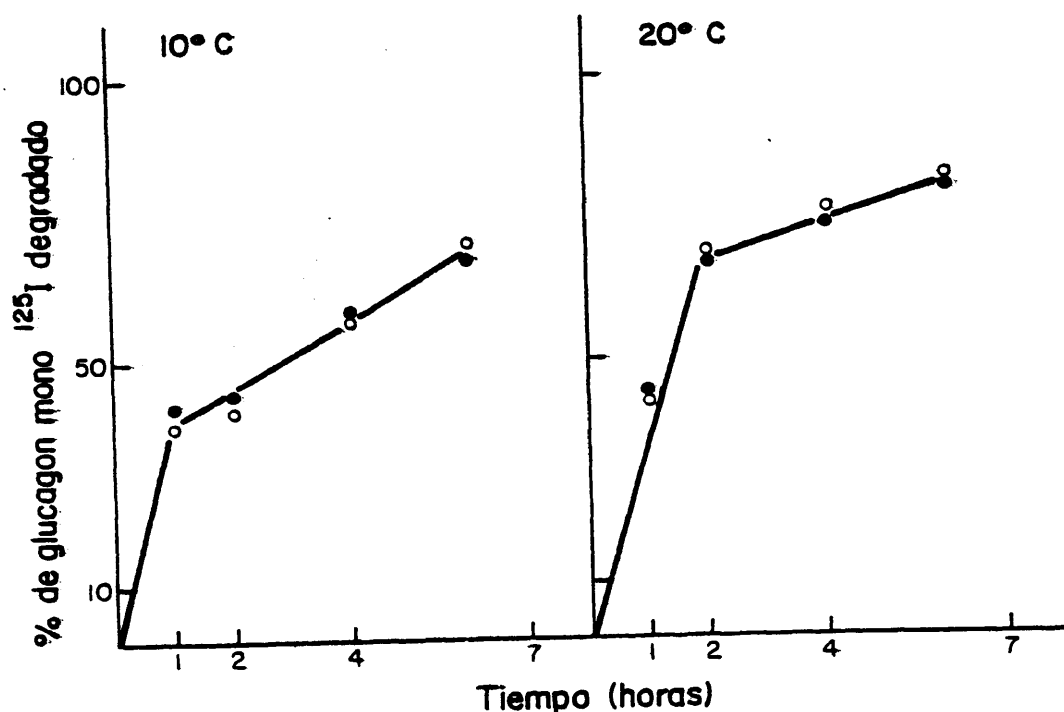


FIGURA 6.- DEGRADACION DE MONO <sup>125</sup>I-GLUCAGON POR MEMBRANAS HEPATICAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 40  $\mu$ G DE G-Z-P/100 G. DE PESO. Membranas plasmáticas ( 0,13 mg de prot./ml ) de ratas controles ( ●—● ) o tratadas con 40  $\mu$ g de G-Z-P ( ○—○ ) fueron incubadas en tampón KRP, alb. 1%, pH 7,5 con mono <sup>125</sup>I-glucagón (  $0,8 \times 10^{-10}$  M ). A los tiempos indicados se tomaron muestras de 0,5 ml y en alícuotas de 0,1 ml del sobrenadante se determinó su capacidad de unión a membranas hepáticas y su solubilidad en TCA al 10%. Los valores están corregidos de forma que la hormona unida específicamente a las membranas se considere no inactivada. Cada punto es la media de 3 experimentos en duplicado.

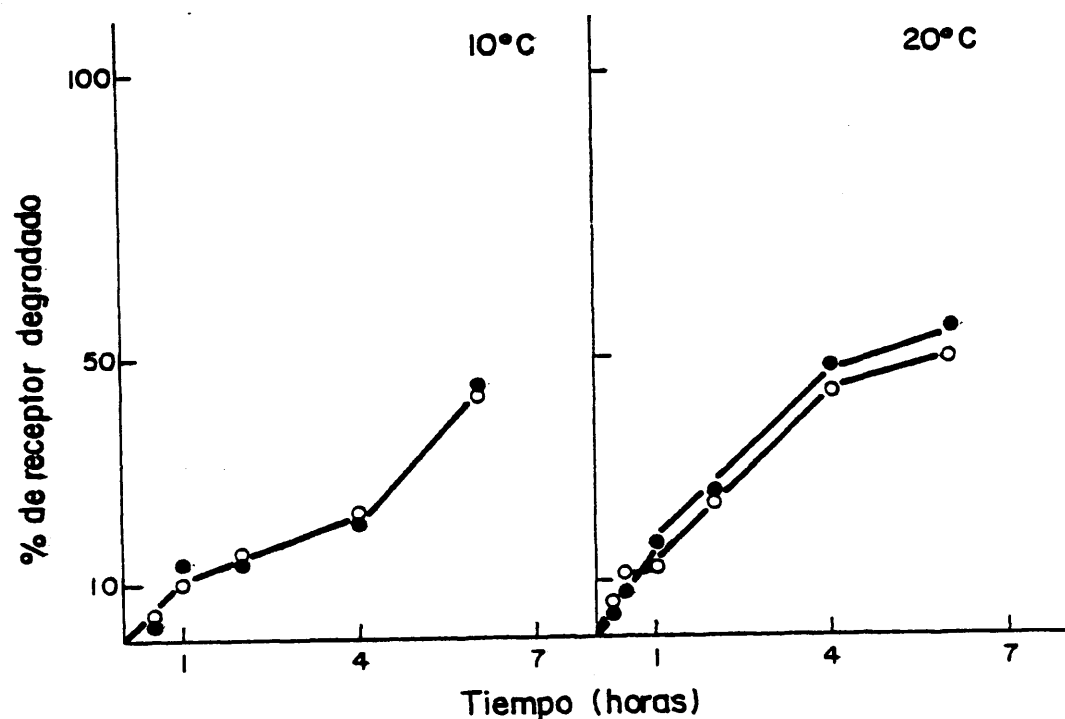


FIGURA 7.- DEGRADACION DEL RECEPTOR DE GLUCAGON EN MEMBRANAS HEPATICAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 40  $\mu$ G DE G-Z-P/100 g. DE PESO. Membranas hepáticas hepáticas ( 0,3 mg de prot./ml ) de ratas controles ( ●—● ) o tratadas con 40  $\mu$ g de G-Z-P ( ○—○ ) se incubaron en KRP, albúmina al 1%, pH 7,5 a 10° y 20°C. En alícuotas de 50  $\mu$ l se determinó su capacidad para unir específicamente mono  $^{125}$ I-glucagón ( $0,7 \times 10^{-10}$  M) a 20°C durante 90 min. El 100% de unión fue el obtenido en el minuto 0 de la incubación. Cada punto es la media de 3 experimentos por duplicado.

G-Z-P/100 g. de peso.

Para determinar la degradación del receptor para glucagón, se incubaron las membranas en tampón KRP BSA 1%, a 10° y 20°C tomándose a diferentes tiempos alícuotas en las que se determinó su capacidad de unir específicamente mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón a una concentración de  $0,7 \times 10^{-10} \text{ M}$ . Los resultados obtenidos se presentan en la Fig.7, referidos en % de la unión en el minuto 0 de incubación de las membranas, observándose que es un fenómeno dependiente de la temperatura, aunque mucho más lento que la inactivación de la hormona. Se requieren más de 4 horas de incubación a 20°C para que los receptores pierdan un 50% de su capacidad para unir mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón, mientras que en ese mismo tiempo solo se ha perdido un 25% de dicha capacidad a 10°C. Sin embargo a ambas temperaturas el proceso es idéntico en membranas de ratas controles y de animales tratados con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g. de peso.

### 1.2.3.- Afinidad y número de receptores para glucagón

Cuando se determinó la unión específica de diferentes concentraciones de glucagón ( 0,2-100  $\text{ng}^{\text{m}}/\text{ml}$  ) a membranas plasmáticas de hígado en condiciones de equilibrio ( Fig.8 panel superior ) observamos que esta fue menor en las membranas de ratas tratadas con G-Z-P que en las controles. Asimismo esta disminución fue proporcional a la cantidad de G-Z-P pre-



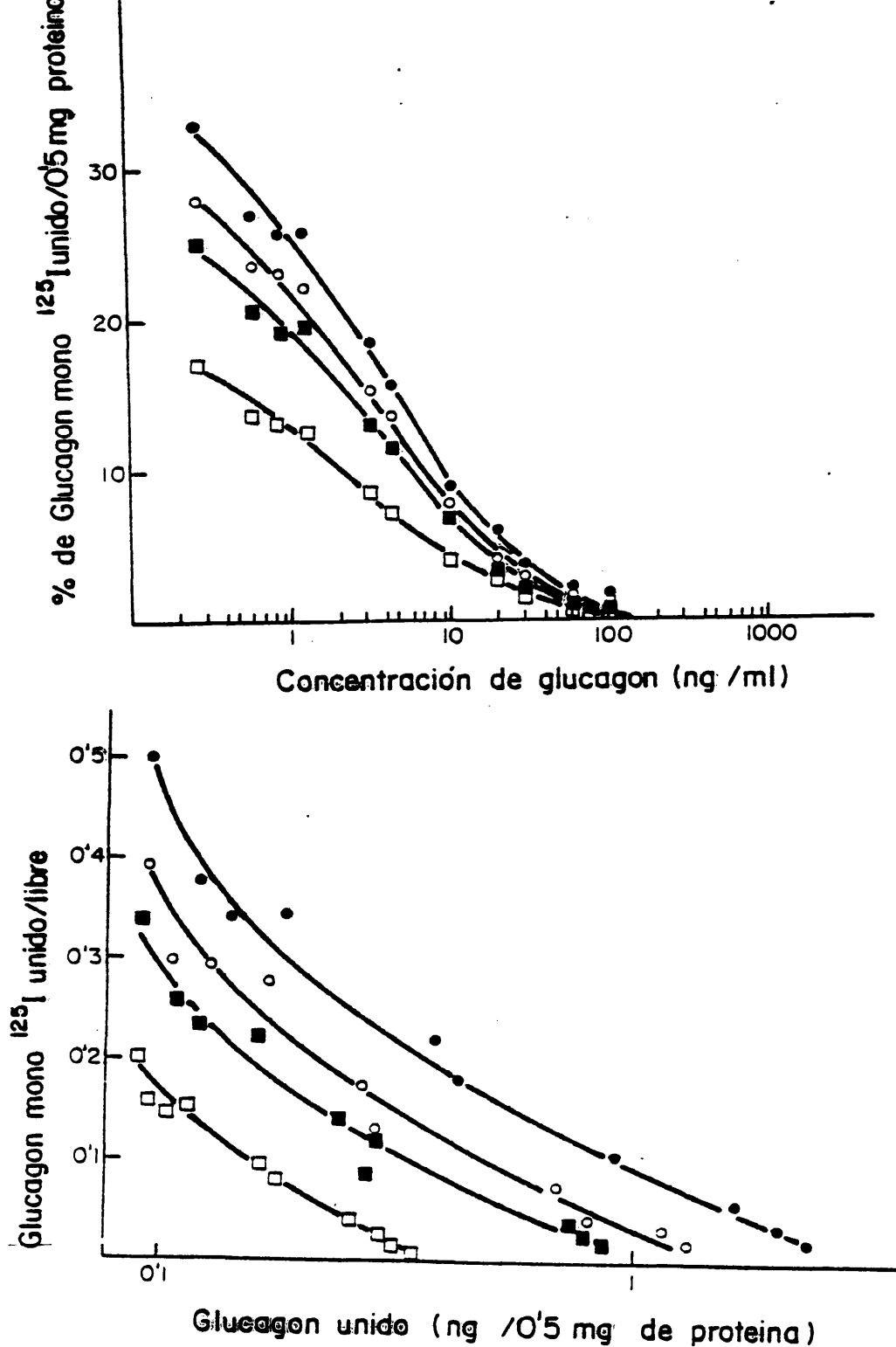


FIGURA 8.- UNION DE GLUCAGON A MEMBRANAS HEPATICAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS Y ANALISIS DE SCATCHARD. Membranas hepáticas (0,15mg/ml) controles (●-●) y tratadas con G-Z-P (20 µg) (○-○), 40 µg (■-■) y 60 µg (□-□) se incubaron con glucagón a las concentraciones indicadas durante 4h. a 20°C determinándose la unión específica. Cada punto es la media de 4 experimentos por duplicado.

viamente administrada a los animales. Cuando estos datos se representaron en forma de hormona unida/hormona libre frente a la cantidad de hormona unida, de acuerdo con Scatchard ( SCATCHARD, 1949 ) se obtuvieron las curvas representadas en el panel inferior de la Fig.8. La interpretación de representaciones curvilíneas es muy difícil. Sin embargo, este tipo de representaciones se las supone constituidas por dos líneas rectas que se cruzan, es decir como si existiesen dos tipos de receptores capaces de unir la hormona con una afinidad diferente y distinto número de sitios. Aceptando esto se puede calcular la afinidad y el número de sitios para cada tipo de receptor, lo cual extrapolado a lo obtenido por nosotros con membranas plasmáticas de ratas controles y tratadas nos da la siguiente información :

- a) Que la afinidad del glucagón por su receptor en membranas plasmáticas de hígado es igual en ratas controles y tratadas con 20, 40 y 60  $\mu\text{g}$  G-Z-P/100 g de peso y esta es de  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  para los receptores de alta afinidad y de  $3,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  para los de baja afinidad.
- b) Que el número de receptores totales disminuye en los animales tratados con G-Z-P y es de 0,95, 0,71, 0,59 y 0,4 pmoles/mg de proteína en controles y tratadas con 20, 40 y 60  $\mu\text{g}$  G-Z-P/100 g de peso, respectivamente, siendo el número de sitios de alta afinidad de un 15% aproximadamente del número total de sitios en todos los casos.

#### 1.2.4.- Unión de mono $^{125}\text{I}$ -insulina

Con objeto de determinar la capacidad de las membranas hepáticas para unir insulina, se incubaron estas con distintas cantidades de insulina tal como se indica en el pie de la Fig.9. En dicha figura puede observarse que no existen diferencias en la unión de insulina a las membranas de ratas - controles o de animales tratados con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g de peso. En ambos casos el 50% de los sitios de unión se hallan ocupados a una concentración de insulina de 23 ng /ml ( $3,8 \times 10^{-9}$  M ) y la saturación se alcanzó a la concentración de  $5 \times 10^{-8}$  -  $10^{-7}$  M.

#### 1.3.- Actividad biológica del glucagón en membranas plasmáticas de hígado.

##### 1.3.1.- Estimulación de la adenilato ciclasa por glucagón.

Como actividad biológica estimulada por glucagón - se determinó la actividad adenilato ciclasa tal como se indica en Material y Métodos. Los resultados presentados en la Fig.10 muestran una mayor activación de la adenilato ciclasa por glucagón (  $0-10^{-6}$  M ) en membranas plasmáticas de hígado de ratas controles con respecto a los animales tratados con 40  $\mu\text{g}$  de

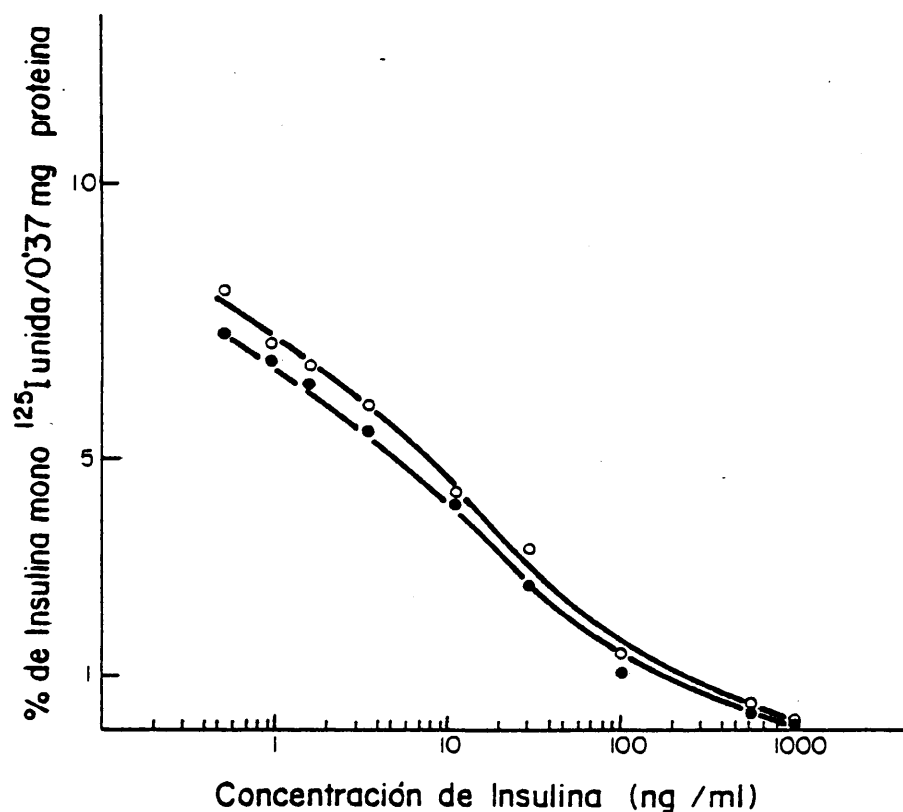


FIGURA 9.- UNION DE INSULINA A MEMBRANAS HEPATICAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 40  $\mu$ G DE G-Z-P/100 G . DE PESO. Membranas hepáticas (0,23 mg/ml) de ratas controles (●—●) y tratadas con 40  $\mu$ g de G-Z-P (○—○), se incubaron con mono <sup>125</sup>I-insulina (0,58 ng/ml) y distintas cantidades de insulina no radiactiva (0,3-1000 ng/ml) en KRP albúmina al 1%, pH 7,5 durante 1h. a 20°C. Cada punto representa la media de 3 experimentos diferentes por duplicado.

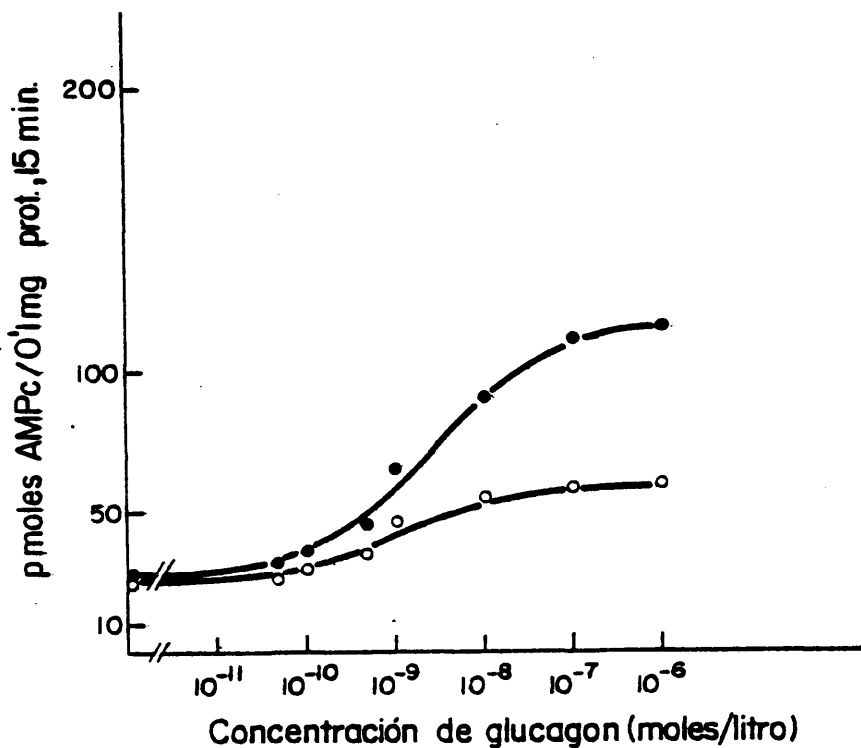


FIGURA 10.- ESTIMULACION POR GLUCAGON DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA EN MEMBRANAS HEPATICAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 40  $\mu$ g DE G-Z-P/100 G. DE PESO. Se incubaron las membranas (0,2 mg/ml), de ratas controles (●—●) y tratadas con 40  $\mu$ g de G-Z-P (○—○) durante 15 min. a 30°C tal como se indicó en Material y Métodos y con diferentes concentraciones de glucagón ( $0-10^{-6}$ M) o con NaF 20 mM. Cada punto representa la media de dos experimentos diferentes por duplicado.

G-Z-P/100 g de peso, lo cual se corresponde con la diferencia en el número de receptores para esta hormona. En ambos casos, la mitad de la respuesta máxima de adenilato ciclasa en las membranas se consiguió con una concentración de glucagón de  $3 \times 10^{-9}$  M. Sin embargo, cuando el estímulo fue - NaF, a una concentración final de 20 mM, la respuesta fue la misma en membranas controles y en aquellas de ratas tratadas con 40  $\mu$ g. G-Z-P/100 g de peso.

## 2.- ESTUDIOS EN HEPATOCITOS AISLADOS

### 2.1.- Interacción de glucagón con hepatocitos aislados.

#### 2.1.1.- Asociación y disociación de mono $^{125}$ I-glucagón

El grado de la asociación de glucagón a hepatocitos se determinó incubando estos con mono  $^{125}$ I-glucagón ( $0,9 \times 10^{-10}$  M) en KRH-Tris, BSA 1%, pH 7,4 y determinándose, a los tiempos indicados, la unión específica en alícuotas de 0,5 ml. Los resultados presentados en la Fig.11 en % de la unión máxima frente al tiempo, muestran que el tiempo necesario para alcanzar el 100% de unión es de 30 minutos a 20°C y de 10 minutos a 30°C, siendo igual tanto para hepatocitos procedentes de ratas controles como de tratadas con 40  $\mu$ g de G-Z-P/100

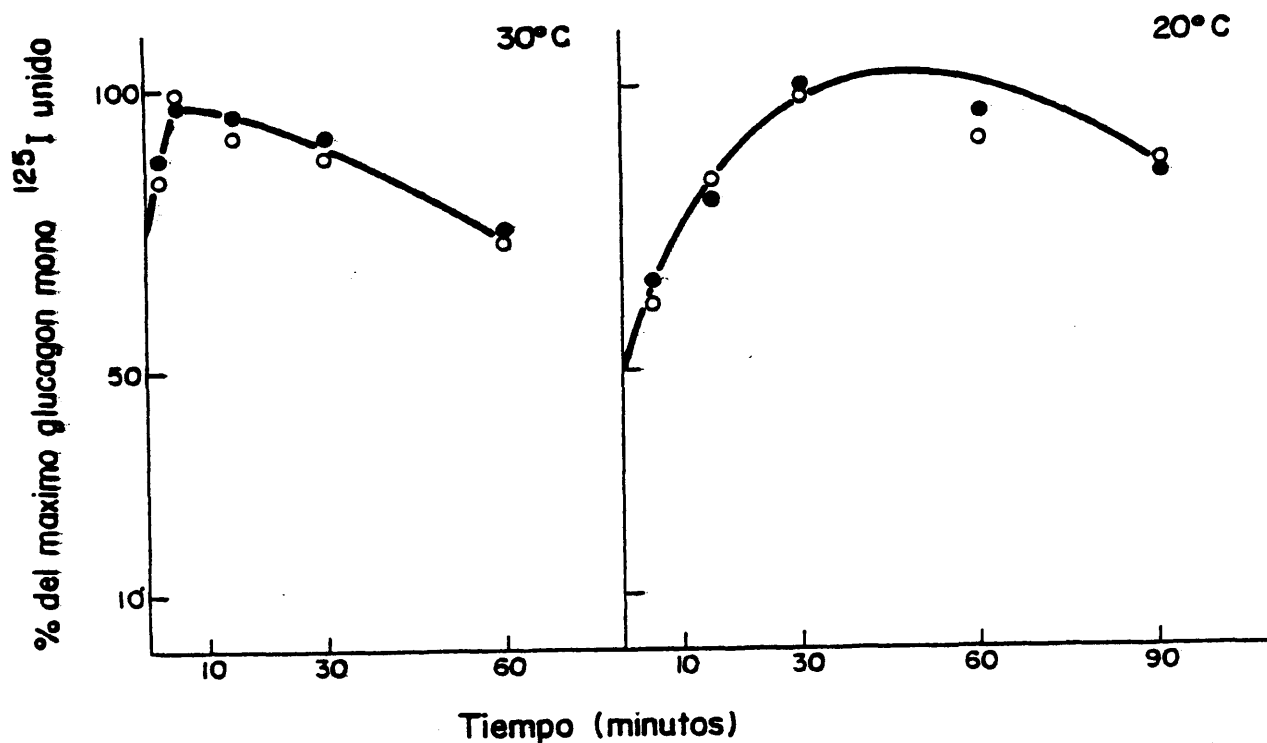


FIGURA 11.- ASOCIACION DE MONO  $^{125}\text{I}$ -GLUCAGON A HEPATOCITOS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 40 µg DE G-Z-P/100 g DE PESO. Se incubaron los hepatocitos ( $10^6$  células/ml) de ratas controles (●—●) y de animales tratados con 40 µg de G-Z-P (○—○) con mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón ( $0,9 \times 10^{-10}\text{M}$ ) en KH tris, pH 7,4, albúmina al 1%. A los tiempos indicados, se determinó la unión específica en 0,5 ml de mezcla de incubación. Cada punto representa la media de 3 experimentos por duplicado.

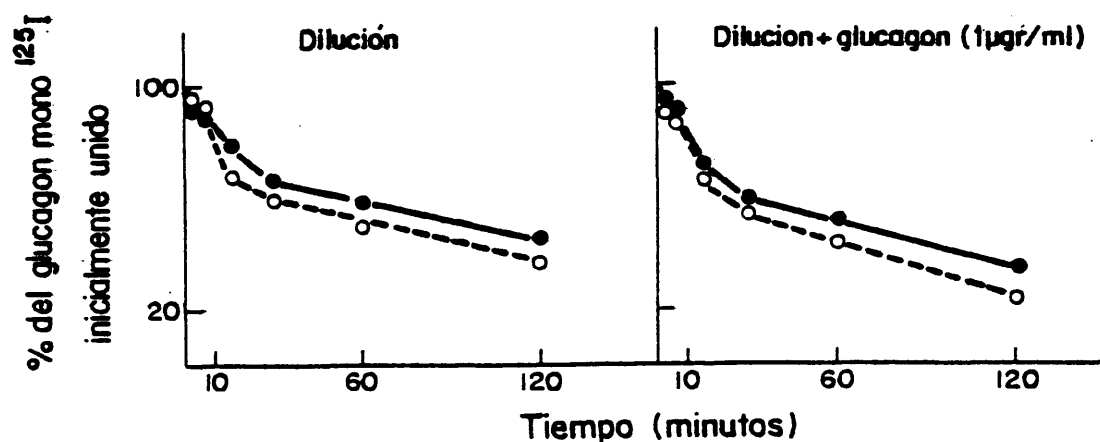


FIGURA 12.- DISOCIACION DE MONO <sup>125</sup>I-GLUCAGON PREVIAMENTE UNIDO A HEPATOCITOS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 40 µg DE G-Z-P/100 G . DE PESO. Después de incubar los hepatocitos de ratas controles (●—●) y animales tratados con 40 µg de G-Z-P (○—○) con mono <sup>125</sup>I-glucagón ( $10^{-10}$  M) en KH tris albúmina al 1%, pH 7,4, durante 30 min. a 20°C, se diluyeron 10 veces con el mismo tampón y se centrifugaron. Las células fueron resuspendidas de nuevo en el mismo tampón con o sin glucagón radiactivo (0,5 µg/ml), incubándose de nuevo a los tiempos indicados.



g: . de peso.

Después de incubar los hepatocitos (  $2 \times 10^6$  células/ml ) 30 minutos a  $20^\circ\text{C}$  con mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón (  $10^{-10}$  M ) se -  
llevó a cabo la disociación del glucagón unido a los mismos lavándolos con un volumen 10 veces superior al de incubación con KRH tris, albúmina 1%, pH 7,4 a  $4^\circ\text{C}$ , y resuspendiéndolos en el mismo tampón en ausencia o presencia de glucagón no marcado (  $0,5 \mu\text{g}$  /ml ) e incubándolos de nuevo a  $20^\circ\text{C}$ . Los resultados obtenidos con este procedimiento se presentan en la Fig.12 en % de la radiactividad unida durante la primera incubación ( minuto 0 ). Como puede observarse, no hay diferencias para la disociación hormonal entre las células controles y - las procedentes de animales tratados con  $40 \mu\text{g}$  de G-Z-P/100 grs. de peso, siendo el curso de esta bastante más rápido que en membranas plasmáticas, ya que a los 20 minutos se ha desprendido un 50% de la cantidad de glucagón previamente unido.

#### 2.1.2.- Degradación de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón

Después de la incubación de hepatocitos procedentes de ratas controles y tratadas con  $40 \mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g: de peso con mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón (  $0,7 \times 10^{-10}$  M ) en KRH tris, pH 7,4, albúmina al 1%, y a los tiempos indicados, se determinó la capacidad del mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón presente en el sobrenadante para unirse a su receptor en membranas plasmáticas de - hígado. Los resultados han sido representados en la Fig13 y,

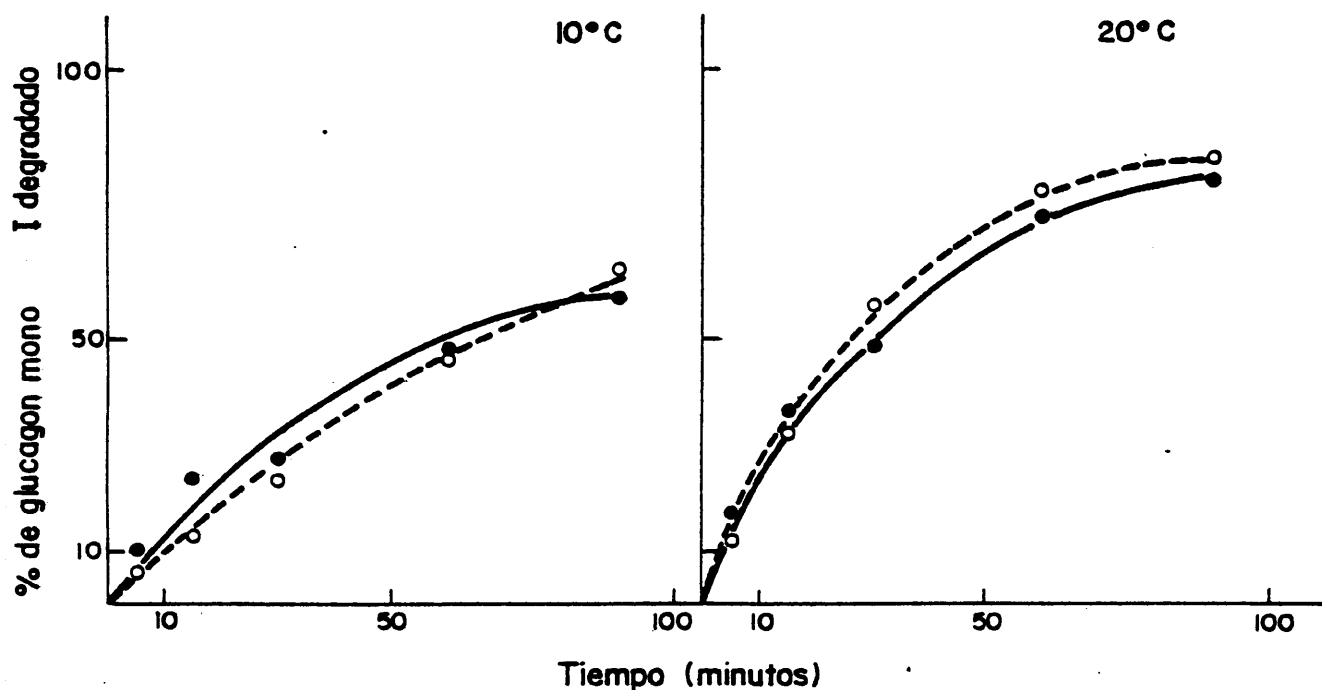


FIGURA 13.- DEGRADACION DE MONO  $^{125}\text{I}$ -GLUCAGON POR HEPATOCITOS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON  $40 \mu\text{g}$  DE G-Z-P/100 G. DE PESO. Se incubaron los hepatocitos ( $10^6$  células/ml) de ratas controles (●—●) y animales tratados con  $40 \mu\text{g}$  de G-Z-P (○—○) en KH tris albúmina al 1%, pH 7,4 con mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón ( $0,7 \times 10^{-10} \text{M}$ ). A los tiempos indicados se tomaron muestras, analizándose la capacidad de unión a membranas del mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón presente en el sobrenadante. Cada punto representa la media de 3 experimentos por duplicado.

como puede observarse, el proceso de degradación es fuertemente dependiente de la temperatura, de tal forma que son necesarios 100 minutos para degradar un 50% del glucagón presente a 10°C, mientras que a 20°C con solo 20 minutos se logra el mismo efecto. Tanto las células procedentes de ratas controles como de animales tratados con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g de peso, degradaron una cantidad semejante de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón.

### 2.1.3.- Afinidad y número de receptores para glucagón.

En la Fig.14, panel superior, se ha representado el % de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón unido en función de diferentes concentraciones de glucagón no radiactivo ( 0,5-1000 ng /ml ) durante 30 minutos a 20°C. Como puede observarse, la cantidad de glucagón unido a hepatocitos procedentes de ratas tratadas con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g de peso fue menor que en hepatocitos controles. Sin embargo, la cantidad de glucagón necesaria para saturar un 50% del número total de receptores fue de  $1-2 \times 10^{-8}$  M, tanto en hepatocitos de ratas controles como tratadas con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g de peso. Cuando se representaron los resultados anteriores según Scatchard ( Fig.14, panel inferior) se obtuvieron representaciones curvilíneas semejantes a las obtenidas con los datos de unión de glucagón a membranas hepáticas. A partir de estas representaciones gráficas se calculan las constantes de afinidad y número de receptores, cuyos valores son los siguientes :

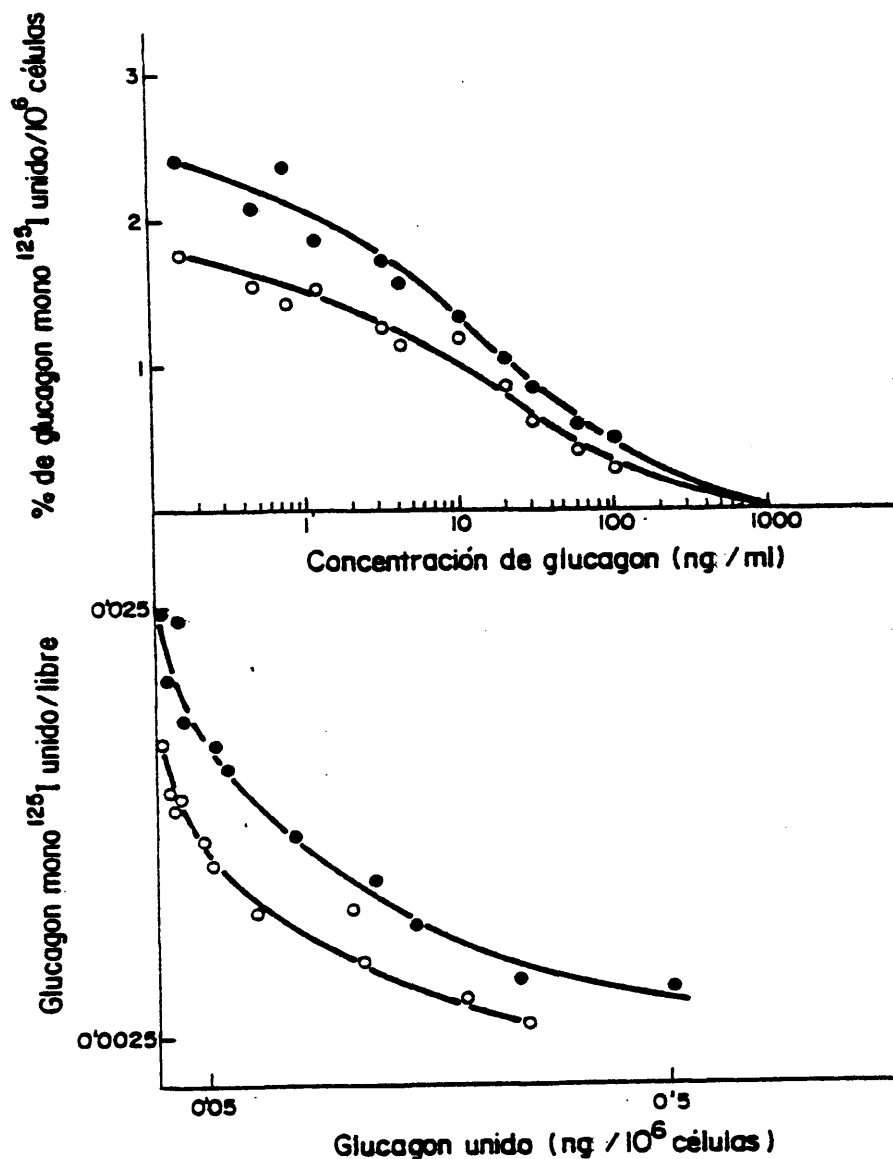


FIGURA 14.- UNION DE GLUCAGON A HEPATOCITOS DE PATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 40 µg DE G-Z-P/100 G .DE PESO Y ANALISIS DE SCATCHARD DE LOS RESULTADOS. Los hepatocitos ( $10^6$  células/ml) de ratas - controles (●—●) y tratadas con 40 µg de G-Z-P (○—○) se incubaron con mono  $^{125}$ I-glucagón (0,2 ng/ml) y con diferentes cantidades de glucagón no marcado (0-1000 ng/ml) durante 30 min. a 20°C en un volumen final de 0,5 ml. AL finalizar el tiempo de incubación se determinó la cantidad de glucagón unido específicamente a las células. Cada punto representa la media de 3 experimentos diferentes por duplicado.

- Para células procedentes de animales controles una constante de alta afinidad de  $0,62 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y otra de baja afinidad de  $0,55 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , siendo el número de sitios totales  $0,2 \text{ pmoles}/10^6 \text{ células}$  y el número de sitios de mayor afinidad de  $0,023 \text{ pmoles}/10^6 \text{ células}$ .

- Para las células procedente de animales tratados con  $40 \text{ µg.}$  de G-Z-P/100 g. de peso una constante de alta afinidad de  $0,62 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y otra de baja afinidad de  $0,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ . - El número de sitios totales fue de  $0,137 \text{ pmoles}/10^6 \text{ células}$  y los de alta afinidad de  $0,0143 \text{ pmoles}/10^6 \text{ células}$ .

## 2.2.- Actividad biológica en hepatocitos aislados de rata.

### 2.2.1.- Efecto del glucagón sobre la producción de AMPc.

La actividad adenilato ciclasa en hepatocitos se determinó midiendo el acúmulo de AMPc en los mismos cuando se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 minutos y medio, con diferentes concentraciones de glucagón en presencia de un inhibidor de su degradación ( teofilina  $2,5 \text{ mM}$  ). El tiempo de incubación de 2 - minutos, 30 segundos se eligió después de comprobar que con él se conseguía el máximo acúmulo de AMPc en respuesta a cualquier concentración de glucagón.

En la Fig.15 puede observarse una clara diferencia en la actividad adenilato ciclasa de los hepatocitos de ratas

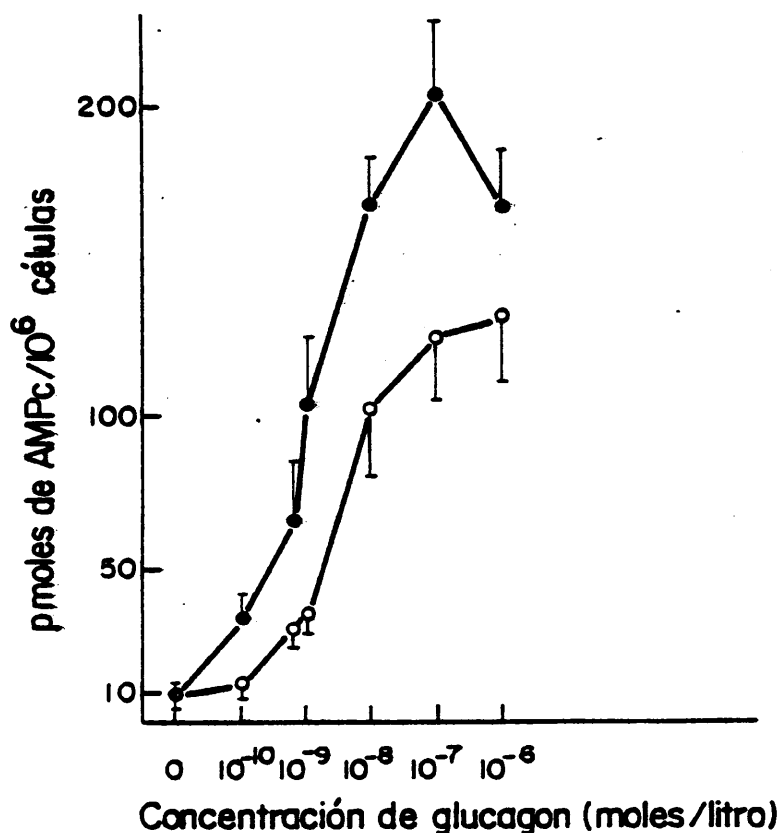


FIGURA 15.- EFECTO DEL GLUCAGON SOBRE LA PRODUCCION DE AMPc POR HEPATOCITOS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 40  $\mu$ g DE G-Z-P/100 G . DE PESO. Los hepatocitos ( $2 \times 10^6$  celulas/ml) de ratas controles (●—●) y de animales tratados con 40  $\mu$ g de G-Z-P (o—o) se incubaron en tampón KHB albúmina 4%, pH7,4 en atmósfera de  $O_2$  y  $CO_2$  ( 95%:5% ) con teofilina 2,5 mM a 37°C durante 2min. 30 segundos y con una agitación moderada en presencia de distintas concentraciones de glucagón. Al finalizar el tiempo de incubación se añadió en cada tubo 0,5 ml de la suspensión celular y 0,5 ml de TCA al 10%, determinándose las concentraciones de AMPc en el sobrenadante. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estandar de 4 experimentos en los controles y 6 experimentos en el grupo de ratas tratadas.

controles frente a los de animales tratados con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g de peso. La actividad adenilato ciclasa estimulada por glucagón fue significativamente inferior en hepatocitos de ratas tratadas con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g de peso que en hepatocitos controles, sin embargo, con ambas poblaciones celulares la máxima activación se obtuvo con una concentración de glucagón de  $10^{-7}$  M y el 50% de la actividad total se logró a una concentración de  $2 \times 10^{-9}$  M.

#### 2.2.2.- Efecto del glucagón sobre la producción de glucosa.

Los hepatocitos aislados se incubaron en tampon Krebs Henseleit bicarbonato , albúmina 4%, pH 7,4 y 10 mM de alanina a 37°C en atmósfera de carbógeno. A la albúmina bovina empleada se le quitaron previamente los ácidos grasos por extracción con carbono activado ( CHEN, 1967 ). Después de 15 minutos de incubación, se toma la primera muestra ( tiempo 0 ) y se añade el estímulo. La incubación se continúa y se toman muestras a los tiempos indicados, la glucosa se determina en el sobrenadante - después de centrifugar las células.

Los resultados se presentan en la Tabla 3 y puede observarse que con una concentración de glucagón  $5,5 \times 10^{-7}$  M la estimulación de la producción de glucosa es mayor en los hepatocitos de animales controles que en los tratados con 40  $\mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g de peso. La estimulación es mayor de forma -

TABLA 3.- ESTIMULACION DE LA PRODUCCION DE GLUCOSA POR GLUCAGON  
 EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS  
 CON 40  $\mu$ G G-Z-P/100 G. DE PESO. MEDIA  $\pm$  ERROR ESTANDAR.  
 N=7.

	$\mu$ g de glucosa/ $10^6$ células				
	Tiempo de incubación ( minutos)				
	15	30	60	90	120
Hepatocitos de ratas controles					
Basal	11 $\pm$ 2	23,8 $\pm$ 3,2	48,6 $\pm$ 6,6	68,6 $\pm$ 8	90 $\pm$ 11
+glucagón (5,5x10 <sup>-7</sup> M)	13,7 $\pm$ 1,9	31,2 $\pm$ 3,5	64 $\pm$ 8	91 $\pm$ 10,5	127 $\pm$ 13,5
Hepatocitos de ratas tratadas					
Basal	11,9 $\pm$ 1,1	23 $\pm$ 2,4	42 $\pm$ 3,6	59 $\pm$ 5,6	76 $\pm$ 7,4
+glucagón (5,5x10 <sup>-7</sup> M)	14,7 $\pm$ 1,1	27,8 $\pm$ 2,8	49 $\pm$ 2,4	65,6 $\pm$ 4,9	81,6 $\pm$ 6,4



significativa a partir de 1 hora, a tiempos de 15 y 30 minutos no hay significación estadística en las diferencias.

### 2.2.3.- Efecto de AMPc en la producción de glucosa.

La incubación de los hepatocitos se lleva a cabo como hemos indicado en el apartado anterior con la única diferencia que se utiliza el AMPc ( 0,8 mM ) como estímulo en sustitución del glucagón. Los resultados se presentan en la Tabla 4 y como se observa hay una clara estimulación en la producción de glucosa en presencia de AMPc. La producción de glucosa es - significativamente mayor en presencia de AMPc tanto en hepatocitos procedentes de animales controles como tratados. Sin embargo, la estimulación es muy similar en ambos casos, no observándose prácticamente diferencias entre ambos.

### 3.- ESTUDIOS CON HEPATOCITOS AISLADOS PREINCUBADOS EN MEDIO 199

Una vez aislados los hepatocitos de ratas, se incubaron en contenedores de plástico durante 15 minutos en tampón - KHB, albúmina al 2%, glucosa ( 1 mg /ml ), pH 7,4 a 37°C en - atmósfera de carbógeno y con una agitación moderada. A continuación se centrifugaron durante 2 minutos a 50xg y se resuspendieron en medio 199 con albúmina al 2%, penicilina ( 2000 U/ml ) y estreptomicina ( 2 mg/ml ), pH 7,4, prosiguiéndose las

TABLA 4.- ESTIMULACION DE LA PRODUCCION DE GLUCOSA POR AMPc EN  
HEPATOCITOS AISLADOS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS -  
CON 40  $\mu$ G DE G-Z-P/100 C . DE PESO. MEDIA<sup>+</sup>ERROR ESTAN-  
DAR N=3.

	$\mu$ g de glucosa/ $10^6$ células				
	tiempo de incubación (minutos)				
	15	30	60	90	120
Hepatocitos de ratas contro- les.					
Basal	9,3 $\pm$ 1,9	22,2 $\pm$ 5,6	45,3 $\pm$ 10,2	77,8 $\pm$ 22	105,11 $\pm$ 26
+AMPc (0,8mM)	15 $\pm$ 1.15	30 $\pm$ 7,5	57,2 $\pm$ 8,6	110,7 $\pm$ 27	130 $\pm$ 27
Hepatocitos de ratas tratadas.					
Basal	18,7 $\pm$ 2,8	33 $\pm$ 5	60,4 $\pm$ 10,9	70,2 $\pm$ 4,6	93,6 $\pm$ 17
+AMPc (0,8mM)	25,4 $\pm$ 4,2	43,9 $\pm$ 7,4	78,94 $\pm$ 12	88,5 $\pm$ 5,4	114 $\pm$ 6,3

incubaciones en las mismas condiciones en que se realizaron - con anterioridad con tampón KHB. A los 15 minutos se añadieron los agentes en cuya presencia se incubaron las células en caso de que ello fuera necesario, tomándose una parte de las células para hacer las determinaciones oportunas correspondientes al minuto 0 de incubación con dichos agentes. Las células, antes de ser utilizadas para cualquier tipo de experiencias, - fueron lavadas con tampón KHB, albúmina al 2%, pH 7,4 e incubadas de nuevo en tampón KHB, albúmina al 2%, glucosa ( 1 mg/ml ) pH 7,4 durante 30 minutos a 37°C al cabo de los cuales - se centrifugaron de nuevo, después de lo cual las células estaban dispuestas para ser resuspendidas en el medio adecuado y utilizadas en el experimento elegido.

### 3.1.- Interacción del glucagón y la insulina con hepatocitos preincubados previamente en medio 199 con o sin glucagón.

#### 3.1.1.- Unión de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón.

Se incubaron los hepatocitos (  $1,5 \times 10^6$  células/ml ) en medio 199 a 37°C con o sin glucagón (  $4 \times 10^{-8}$  M ), tomándose a diferentes tiempos muestras celulares que después de lavadas se incubaron en KH tris albúmina 1%, pH 7,4 con mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón (  $10^{-10}$  M ), durante 30 minutos a 20°C, determinándose a continuación la unión de la hormona a su receptor.

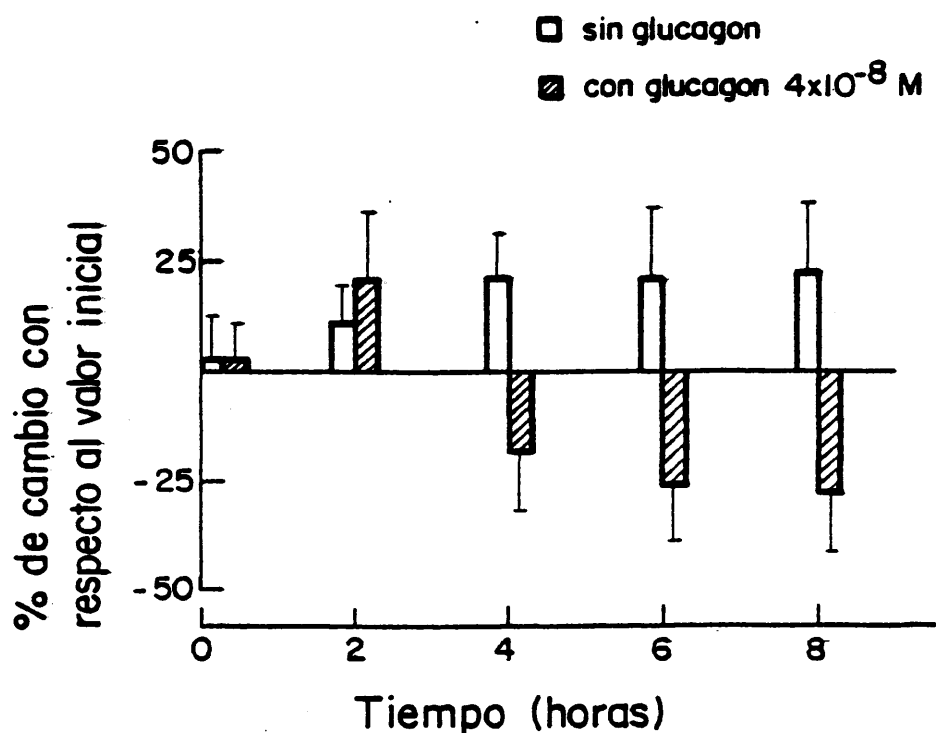


FIGURA 16.- UNION DE MONO  $^{125}\text{I}$ -GLUCAGON A HEPATOCITOS PREINCUBADOS EN PRESENCIA O AUSENCIA DE GLUCAGON. Los hepatocitos se incubaron en medio 199, albúmina al 2%, pH 7,4 con o sin glucagón - ( $4 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$ . A los tiempos indicados se tomaron muestras de la suspensión celular, las cuales se lavaron durante 30 min. a  $37^\circ\text{C}$  en tampón KHB albúmina al 2%, glucosa 0,1%, pH 7,4. A continuación se determinó la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón ( $10^{-10} \text{ M}$ ) en tampón KH tris albúmina al 1% pH 7,4 a  $20^\circ\text{C}$  durante 30 min. Cada punto representa la media  $\pm$  error estandar de 5 experimentos por duplicado.

Un problema que podría surgir sería que quedara glucagón unido a las células que se han preincubado en su presencia y ello interfiriera con la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón. Sin embargo, parece que el proceso de lavado es suficiente para disociar todo el glucagón unido a la célula, ya que si se incuban hepatocitos a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos con glucagón ( $10^{-7}\text{M}$ ) en medio 199 y se lavan después tal como hemos indicado, la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón a  $20^{\circ}\text{C}$  en KH tris, albúmina al 1%, pH 7,4, es igual para hepatocitos preincubados o no con glucagón ( $10^{-7}\text{M}$ ).

Los resultados obtenidos se presentan en la Fig.16 y como puede observarse a las 2 horas de incubación, con o sin glucagón ( $4 \times 10^{-8}\text{M}$ ), no hubo diferencia en la unión específica de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón, incluso fue un poco mayor en células incubadas con glucagón. Sin embargo, a las 4 horas, ya se observó una diferencia en la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón a células incubadas en presencia ( $4 \times 10^{-8}\text{M}$ ) o ausencia de glucagón, de tal forma, que la unión en células no incubadas con glucagón aumentó con respecto a la unión inicial ( tiempo 0 ) del orden de un 25% y aproximadamente esa misma cantidad disminuyó en aquellas preincubadas con glucagón.

### 3.1.2.- Unión de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón a hepatocitos preincubados con diferentes concentraciones de glucagón.

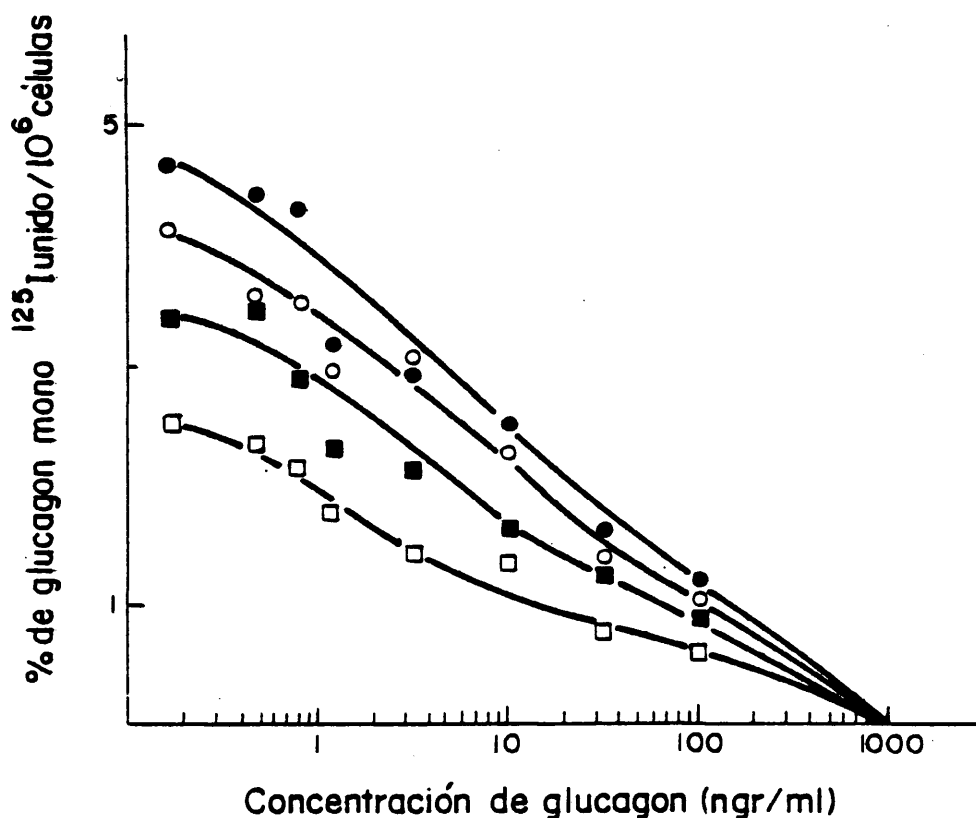


FIGURA 17.- UNION DE GLUCAGON A HEPATOCITOS PREINCUBADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCAGON. Después de preincubar en medio 199 a 37°C durante 6 h. los hepatocitos sin (●—●) o con glucagón  $10^{-9}$  M (○—○),  $5,7 \times 10^{-9}$  M (■—■) y  $2,8 \times 10^{-8}$  M (□—□) se lavaron y se determinó la unión específica a los mismos de mono  $^{125}$ I-glucagón (0,2 ng/ml) en presencia de cantidades crecientes de glucagón no radiactivo (0,3-1000 ngr/ml) a 20°C durante 30 min. - Cada punto representa la media de 3 experimentos diferentes por duplicado.

Para estudiar la relación entre la unión de glucagón a células aisladas con las concentraciones de glucagón con las que fueron preincubadas, los hepatocitos se preincubaron en medio 199 con o sin glucagón a diferentes concentraciones - ( $10^{-9}$  M,  $5,7 \times 10^{-9}$  M y  $2,8 \times 10^{-8}$  M) durante 6 horas. Al cabo de ese tiempo, se lavaron las células y se determinó la unión de glucagón utilizando distintas concentraciones de la hormona.

Los resultados obtenidos pueden observarse en la Fig. 17. La unión disminuyó de una forma inversa a la concentración de glucagón a la que estuvieron expuestas las células, obteniéndose este efecto a todas las concentraciones de la hormona - ensayadas (0,3-1000 ng/ml). Cuando los resultados presentados en la Fig. 17 se representaron según Scatchard y se calculó el número de sitios de unión para glucagón por  $10^6$  células, se observó que no existían diferencias en las constantes de afinidad y la diferencia en la unión de glucagón fue interpretada como una disminución en el número de sitios de unión para el mismo.

### 3.1.3.- Degradación de mono $^{125}\text{I}$ -glucagón.

Los hepatocitos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  6 horas en medio 199, como ya se indicó anteriormente, con ( $4 \times 10^{-8}$  M.) o sin glucagón y después de lavarlos se determinó su capacidad para degradar mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón. Para ello se incubaron con mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón ( $0,63 \times 10^{-10}$  M) a  $20^\circ\text{C}$  en KH tris, albúmina al

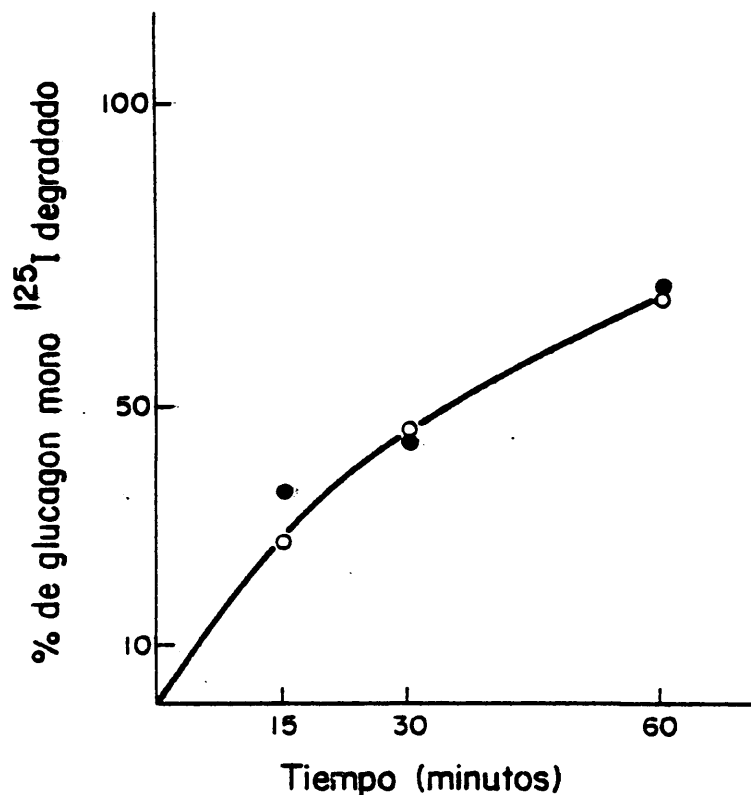


FIGURA 18.- DEGRADACION DE MONO <sup>125</sup>I-GLUCAGON POR HEPATOCITOS PRE-INCUBADOS CON O SIN GLUCAGON. Se incubaron los hepatocitos durante 6 horas a 37°C en medio 199 con ( $4 \times 10^{-8}$  M) o sin glucagón y después de lavarlos se determinó su capacidad para degradar mono <sup>125</sup>I-glucagón. Para ello los hepatocitos ( $10^6$  cel./ml) pre-incubados sin (●—●) o con glucagón (○—○) se incubaron en KH - tris albúmina 1% pH 7,4 con mono <sup>125</sup>I-glucagón ( $0,6 \times 10^{-10}$  M) a 20°C. A los tiempos indicados se tomaron muestras de la mezcla de incubación, las cuales se centrifugaron y del sobrenadante se tomaron alícuotas en las que se determinó la unión específica a membranas hepáticas y la solubilidad en TCA 10% del mono - <sup>125</sup>I-glucagón presente. Cada punto representa la media de 3 experimentos diferentes por duplicado.



1%, pH 7,4 y se tomaron muestras a los tiempos indicados, - determinándose la capacidad del mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón del sobrenadante para unirse de nuevo a su receptor en membranas hepáticas. En la Fig.18 puede observarse que, en ambos casos (células preincubadas o no con glucagón), la degradación del mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón fue semejante. El 50% de glucagón presente fue degradado en 35 minutos, tanto en células preincubadas o no con glucagón.

También se determinó la solubilidad del mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón del sobrenadante en TCA al 10% ( resultados no presentados ) y tampoco se observaron diferencias entre hepatocitos preincubados o no con glucagón (  $4 \times 10^{-8} \text{ M}$  ). Sin embargo, la degradación fue mucho menor, como consecuencia de la menor sensibilidad de este método.

#### 3.1.4.- Unión de mono $^{125}\text{I}$ -insulina

Después de incubar en medio 199 los hepatocitos durante 6 horas a  $37^\circ\text{C}$  sin glucagón, con glucagón (  $4 \times 10^{-8} \text{ M}$  ) o con cicloheximida (  $1 \mu\text{g/ml}$  ), se lavaron y se determinó la unión específica de mono  $^{125}\text{I}$ -insulina (  $0,9 \times 10^{-10} \text{ M}$  ) a los mismos a  $30^\circ\text{C}$  en ~~KH~~  $\text{Eris}$ , albúmina al 1%, pH 7,4. Como puede observarse en la Fig.19, la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -insulina fue igual tanto en células preincubadas con glucagón como preincubadas sin glucagón, sin embargo cuando se preincubaron con cicloheximida (  $1 \mu\text{g/ml}$  ) a una concentración capaz de inhibir

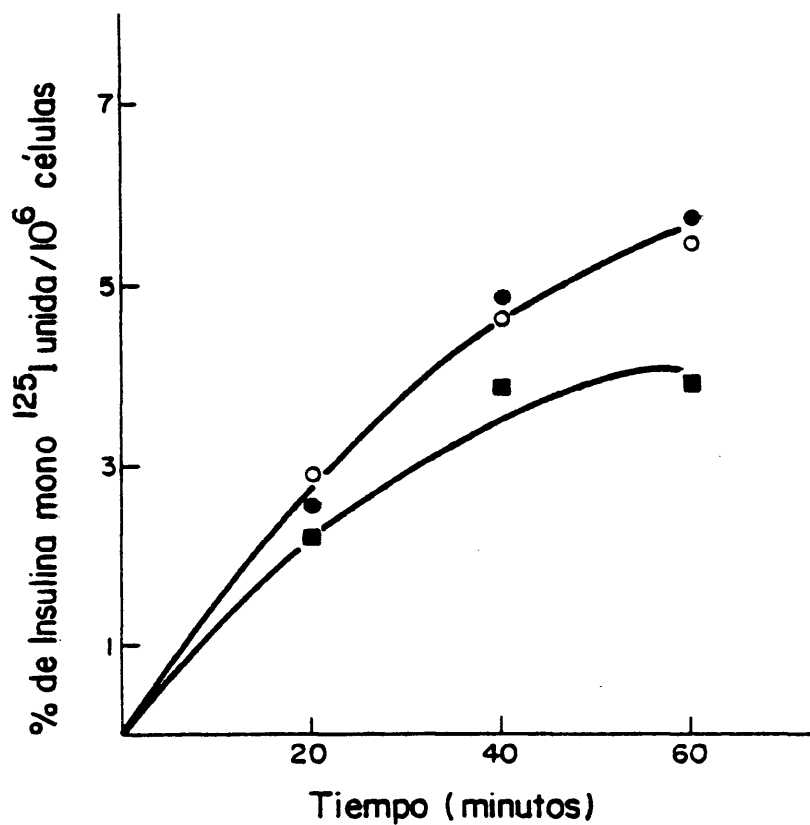


FIGURA 19.-UNION DE MONO  $^{125}\text{I}$ -INSULINA A HEPATOCITOS PREINCUBADOS O NO CON GLUCAGON Y CICLOHEXIMIDA. Una vez preincubadas las células en medio 199 durante 6 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  sin (●—●) o con glucagón  $4 \times 10^{-8}\text{M}$  (○—○) o con cicloheximida  $1\mu\text{g/ml}$  (■—■) se lavaron determinándose la unión del mono  $^{125}\text{I}$ -insulina ( $0,9 \times 10^{-10}\text{M}$ ) a las mismas a  $30^{\circ}\text{C}$ . Cada punto representa la media de 3 experimentos por duplicado.

por completo la síntesis de proteínas, en los hepatocitos, la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -insulina fue un poco menor. El equilibrio se alcanzó a los 60 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$  y se necesitaron 20 minutos para que se uniera un 50% de la cantidad máxima.

### 3.1.5.- Afinidad y número de receptores para glucagón.

En condiciones de equilibrio se determinó la unión de glucagón a hepatocitos preincubados previamente durante 6 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en medio 199 con o sin glucagón ( $4 \times 10^{-8} \text{ M}$ ). En el panel superior de la Fig.20 puede observarse que existe una mayor unión de glucagón a todas las concentraciones ensayadas ( $0,16$ - $1000 \text{ ng/ml}$ ) en las células preincubadas sin glucagón en comparación con las preincubadas en presencia de la hormona. La concentración de glucagón necesaria para saturar el 50% de los receptores totales de glucagón fue de  $10^{-8} \text{ M}$  en células preincubadas o no con glucagón y a una concentración de  $10^{-7} \text{ M}$  la saturación fue completa.

Cuando los datos de la Fig.20 se representaron según Scatchard (panel inferior), se obtuvieron dos curvas paralelas correspondientes a las células preincubadas sin o con glucagón. Después de calcular los parámetros correspondientes obtuvimos:

- En células preincubadas sin glucagón : constante de unión de glucagón de alta afinidad  $0,78 \pm 0,08 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y de baja afinidad  $0,9 \pm 0,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , con un número total de sitios de  $0,2 \text{ pmo}$

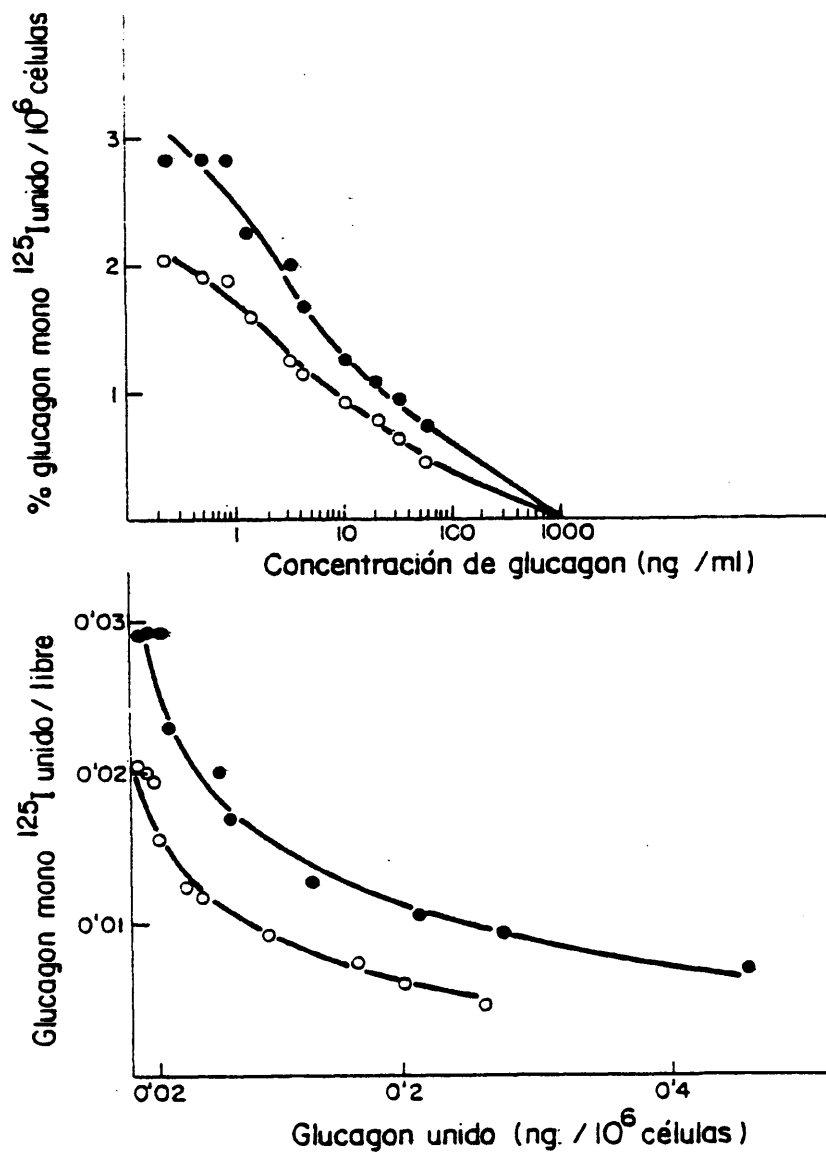


FIGURA 20.- UNION DE GLUCAGON A HEPATOCITOS PREINCUBADOS CON O SIN GLUCAGON Y ANALISIS DE SCATCHARD DE LOS RESULTADOS. Después de preincubar los hepatocitos durante 6 h. a  $37^{\circ}\text{C}$  en medio 199 sin (●—●) o con glucagón  $4 \times 10^{-8}\text{M}$  (○—○) se lavaron determinándose la unión específica de glucagón a diferentes concentraciones ( 0,16-1000 ng/ml ) en KHtris albúmina al 1% pH 7,4 a  $20^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. La concentración celular fue de  $10^6$  células/ml. Cada punto representa la media de 4 experimentos por duplicado.

les  $\pm 0,04/10^6$  células y los correspondientes al sitio de alta afinidad de  $0,037 \pm 0,0057$  pmoles/ $10^6$  células.

- En células preincubadas con glucagón : constante de alta afinidad  $0,71 \pm 0,04 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y de baja afinidad  $0,92 \pm 0,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  siendo el número de sitios totales  $0,128 \pm 0,037$  pmoles/ $10^6$  células y los de alta afinidad de  $0,022 \pm 0,0057$  pmoles/ $10^6$  células.

### 3.2.- Actividad biológica de glucagón en hepatocitos preincubados con o sin glucagón.

#### 3.2.1.- Efecto de glucagón sobre la producción de AMPc.

Las células previamente incubadas en medio 199 durante 6 horas a  $37^\circ\text{C}$  en presencia ( $4 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) o no de glucagón fueron lavadas y a continuación se determinó el acúmulo de AMPc en presencia de diferentes concentraciones de glucagón ( $0-10^{-6} \text{ M}$ ) en tampón KRB, albúmina al 4%, pH 7,4 y 2,5 mM teofilina a  $37^\circ\text{C}$  durante dos minutos treinta segundos. Los resultados presentados en la Fig.21 muestran que la estimulación del glucagón sobre el acúmulo de AMPc fue claramente inferior en los hepatocitos preincubados con glucagón que en aquellos que se preincubaron sin la hormona. Sin embargo, en ambos casos, la estimulación máxima se consiguió a una concentración de glucagón  $10^{-7} \text{ M}$ , mientras que la concentración de glucagón necesaria para lograr una estimulación del 50% de la estimulación

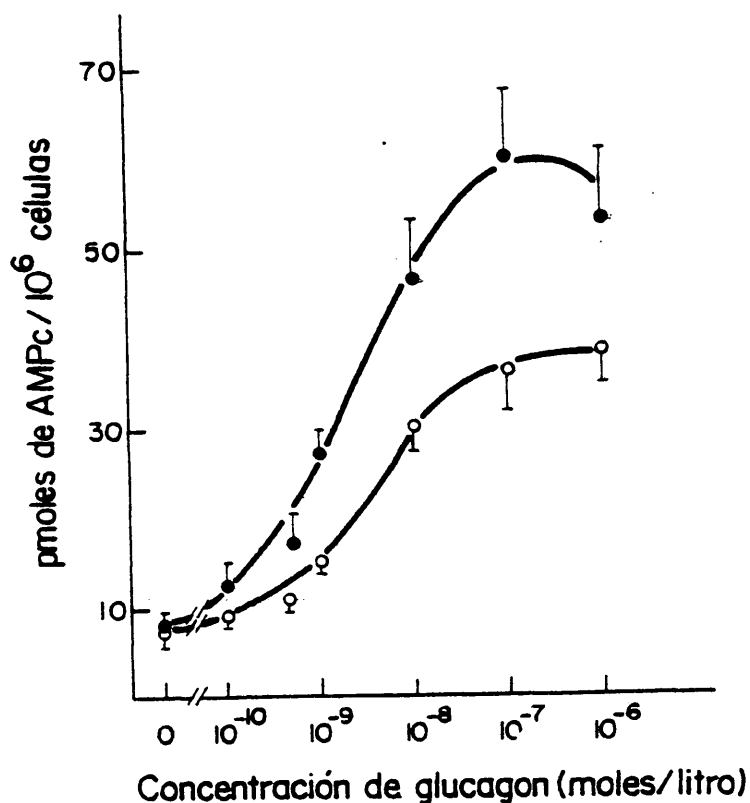


FIGURA 21.- EFECTO DEL GLUCAGON SOBRE LA PRODUCCION DE AMPc EN HEPATOCITOS PREINCUBADOS O NO CON GLUCAGON. Una vez preincubados en medio 199, albúmin al 2% pH 7,4 durante 6 horas a 37°C sin (●—●) o con glucagón  $4 \times 10^{-8} M$  (○—○) los hepatocitos se lavaron, - incubándose posteriormente en KHB albúmina al 4%, teofilina 2,5 mM a 37°C durante 2 min. 30 seg. en presencia de diferentes concentraciones de glucagón ( $0-10^{-6} M$ ). Al cabo del tiempo indicado se tomó en cada tubo 0,5 ml de suspensión celular y 0,5 ml de TCA al 10% determinándose posteriormente el AMPc presente en el sobrenadante. Cada punto representa la media  $\pm$  error estandar de 6 experimentos diferentes.

máxima, fue de  $2,5 \times 10^{-9}$  M tanto en hepatocitos preincubados con glucagón como preincubados sin él.

### 3.2.2.- Efecto de la L-adrenalina sobre la producción de AMPc.

Tras la preincubación de los hepatocitos en presencia o ausencia de glucagón, la incubación de aquellos con L-adrenalina ( $5 \times 10^{-5}$  M) produjo una acumulación de AMPc que se ha representado gráficamente en la Fig.22. La L-adrenalina provocó una acumulación de AMPc que fue máxima a los 2 minutos - disminuyendo a continuación. Tanto en hepatocitos preincubados con ( $4 \times 10^{-8}$  M) o sin glucagón, el acúmulo de AMPc a los 2 - minutos de incubación fue igual y 2,5 veces superior a los - valores basales.

### 3.3.- Efecto de la preincubación con cicloheximida y glucagón.

#### 3.3.1.- Efecto de glucagón y cicloheximida sobre la síntesis de proteínas en hepatocitos.

Los hepatocitos ( $10^6$  células/ml) se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en medio 199, albúmina al 2%, que contenía L-valina - ( $0,2$  mM). A los 15 minutos de incubación se añadieron glucagón

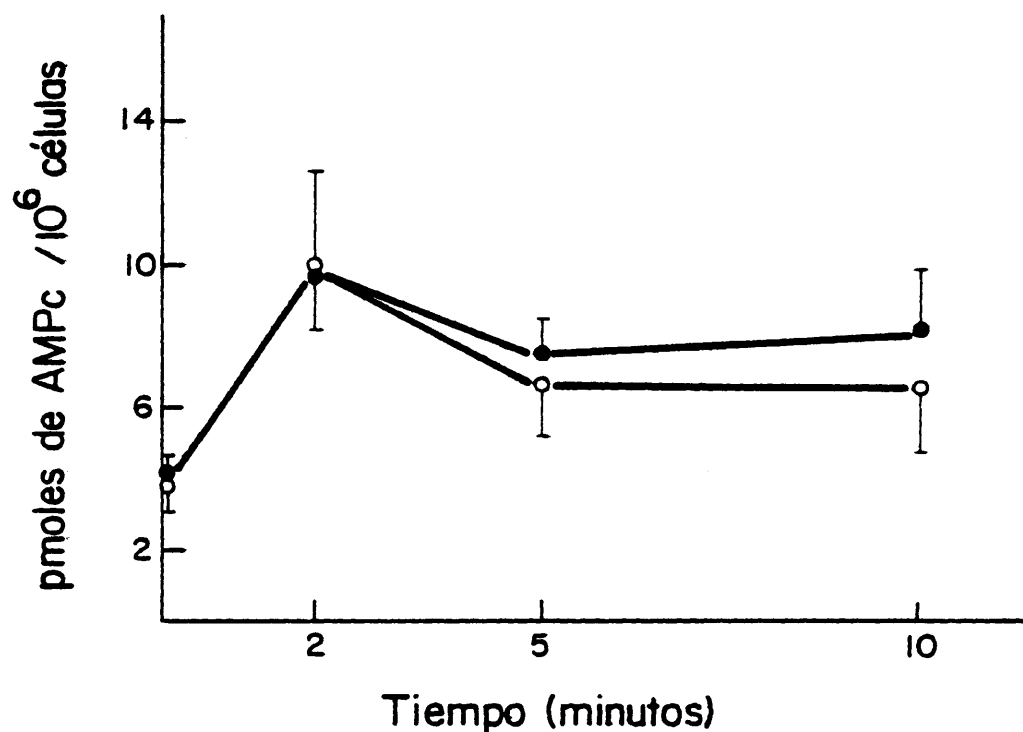


FIGURA 22.- EFECTO DE LA L-ADRENALINA SOBRE LA PRODUCCION DE AMPc EN HEPATOCITOS PREINCUBADOS CON O SIN GLUCAGON. Los hepatocitos se preincubaron en medio 199, albúmina al 2% pH 7,4 durante 6 h. a 37°C sin (●—●) o con glucagón  $4 \times 10^{-8}$  M (o—o) y se lavaron posteriormente. A continuación se resuspendieron ( $2 \times 10^6$  cél./ml) en KHB albúmina al 4% pH 7,4 con L-adrenalina ( $5 \times 10^{-5}$  M) y se incubaron a 37°C con agitación moderada. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 0,5 ml en las que se determinó el AMPc después de precipitar con 0,5 ml de TCA al 10%. Cada punto representa la media  $\pm$  error estandar de 4 experimentos diferentes.



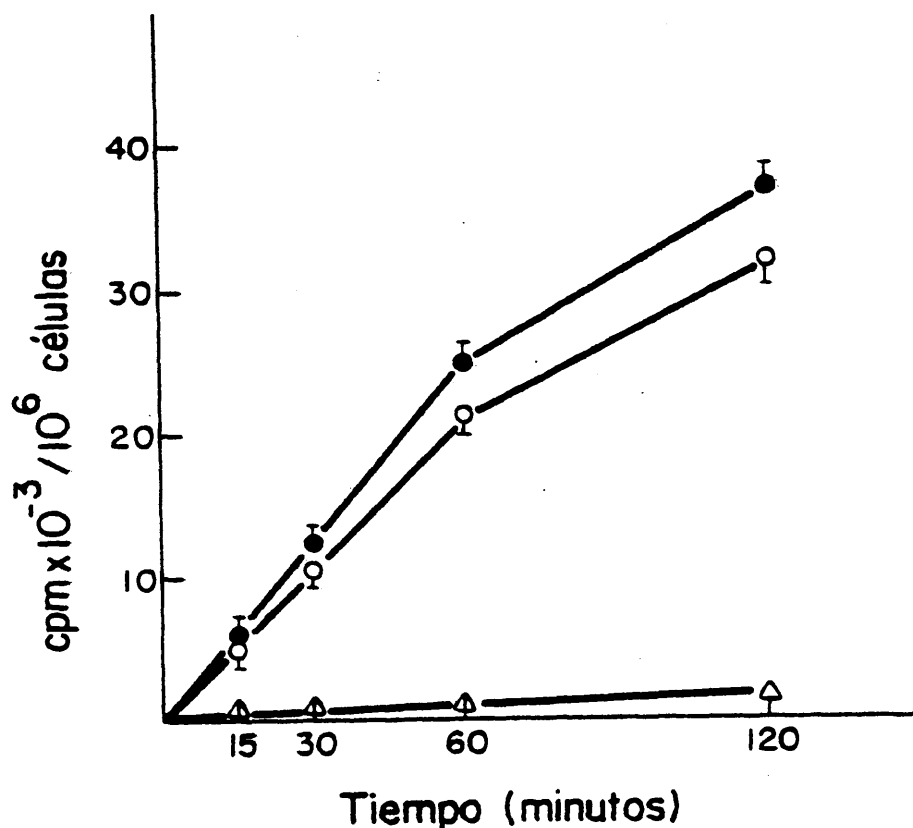


FIGURA 23.- EFECTO DEL GLUCAGON Y LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN HEPATOCITOS. Se incubaron los hepatocitos - ( $10^6$  cél./ml) a  $37^\circ\text{C}$  en medio 199 albúmina al 2% pH 7,4 o,2 mM  $\text{L-}^{14}\text{C}$ -valina (2mCi/mmol) en ausencia (●—●) o presencia de glucagón  $4 \times 10^{-8}\text{M}$  (○—○) o cicloheximida  $1 \mu\text{g/ml}$  (Δ—Δ). A los tiempos indicados se tomaron muestras de 0,5 ml donde se determinó la radiactividad precipitable con TCA al 5%. Cada punto representa la media  $\pm$  error estandar de 3 experimentos.

gón (  $4 \times 10^{-8}$  M, final ), cicloheximida ( 1  $\mu$ g/ml, final ) y - L- $^{14}$ C-valina ) hasta conseguir una actividad específica de 2 mCi/mmol en el medio de incubación. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 0,5 ml, que después de centrifugadas ( 5 minutos a 3000 rpm ), el precipitado se resuspendió en 0,5 ml de agua destilada a los que se añadió 0,5 ml de TCA al 10% a 4°C. A continuación se determinó la radiactividad presente en el precipitado, mediante filtración con filtros Whatman GF/C. La radiactividad presente en los filtros se determinó con líquido de centelleo sin Tritón X-100.

Los resultados presentados en la Fig.23 indican que la incorporación de  $^{14}$ C-valina en proteínas fue lineal durante la primera hora, disminuyendo el ritmo de incorporación durante la segunda hora. Asimismo puede observarse una pequeña diferencia en la síntesis de proteínas en aquellas células que fueron incubadas con glucagón (  $4 \times 10^{-8}$  M ), siendo prácticamente nula en aquellos hepatocitos incubados con cicloheximida ( 1  $\mu$ g/ml ).

### 3.3.2.- Unión de mono $^{125}$ I-glucagón a hepatocitos incubados previamente con glucagón y cicloheximida.

Los hepatocitos se incubaron a 37°C en medio 199, albúmina 2%, pH 7,4 en ausencia o presencia de glucagón (  $4 \times 10^{-8}$  M ), cicloheximida ( 1  $\mu$ g/ml ) o cicloheximida más glucagón . A los tiempos indicados se tomaron muestras en las que se determinó la unión de mono  $^{125}$ I-glucagón (  $0,6 \times 10^{-10}$  M ) a 20°C en KH tris

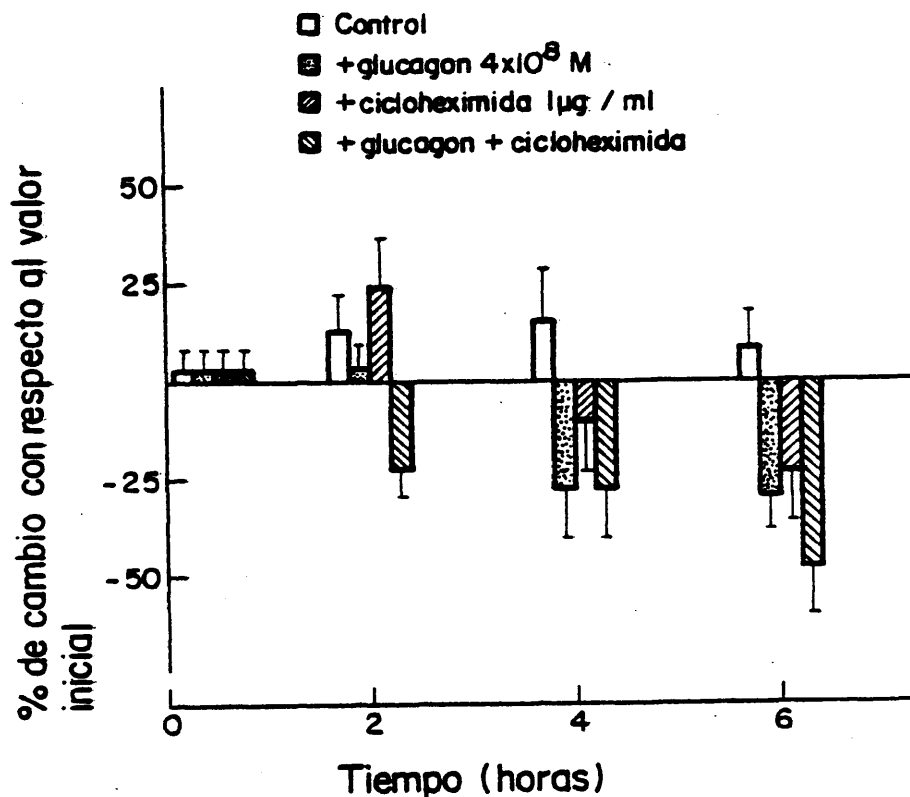


FIGURA 24. ← UNION DE MONO  $^{125}\text{I}$ -GLUCAGON A HEPATOCITOS PREINCUBADOS CON GLUCAGON Y CICLOHEXIMIDA. Los hepatocitos se incubaron en medio 199, albúmin al 2% a  $37^{\circ}\text{C}$  en las condiciones indicadas en la figura. A los tiempos indicados se tomaron muestras y se lavaron las células. Después de lo cual se incubaron en KH tris albúmina al 1% pH 7,4 a  $20^{\circ}\text{C}$  con mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón ( $0,6 \times 10^{-10}\text{M}$ ) durante 30 min., al cabo de los cuales se determinó la unión específica. Cada punto representa la media  $\pm$  error estandar de 4 - experimentos diferentes.

albúmina al 1%, pH 7,4. En la Fig 24 observamos que a las dos horas de incubación la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón fue igual en las células incubadas con glucagón o cicloheximida en relación al control, detectándose una pequeña tendencia a disminuir en las incubadas con glucagón más cicloheximida. A las 4 horas de incubación ya se pudo observar una pequeña diferencia en la unión de mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón entre los controles y los hepatocitos incubados con glucagón, siendo esta diferencia más clara a las 6 horas. A este tiempo de incubación la unión hormonal a las células incubadas con cicloheximida fue menor que en los controles, siendo aún más marcado este fenómeno en las células preincubadas con glucagón más cicloheximida. Por tanto, parece que el efecto del glucagón se puede manifestar en presencia de una concentración de cicloheximida capaz de inhibir por completo la síntesis de proteínas.

### 3.3.3.- Afinidad y número de receptores para glucagón en hepatocitos preincubados previamente con glucagón y cicloheximida.

Los hepatocitos se preincubaron en medio 199 a 37°C con  $(4 \times 10^{-8} \text{ M})$  o sin glucagón, cicloheximida  $(1 \mu\text{g/ml})$  o glucagón más cicloheximida a las mismas concentraciones durante 6 horas. Al cabo de ese tiempo, las células se lavaron determinándose la unión específica de glucagón a diferentes concen-

traciones ( 0,16-1000 ng/ml ) en KH tris, albúmina al 1%, pH 7,4 a 20°C durante 30 minutos.

Los resultados presentados en la Fig.25 muestran una disminución en la unión de glucagón a hepatocitos preincubados con glucagón (  $4 \times 10^{-8}$  M ) que fue de aproximadamente un 35% a la concentración más baja de glucagón ( 0,16 ng/ml ) y que se mantiene a lo largo de todas las concentraciones ensayadas. - También fue menor la unión de glucagón a hepatocitos preincubados con cicloheximida y con glucagón más cicloheximida. Además la unión de glucagón a células preincubadas con glucagón más cicloheximida fue menor que en aquellas preincubadas con cicloheximida solamente, siendo la diferencia de aproximadamente un 35%, a la concentración más baja de glucagón.

Cuando los datos se representaron según Scatchard - ( Fig.25, panel inferior ), se obtuvieron 4 curvas muy similares. La afinidad fue muy semejante en todos los grupos, modificándose el número de sitios totales de la siguiente forma :

-  $0,2 \pm 0,04$  pmoles/ $10^6$  células, en preincubadas en ausencia de glucagón y cicloheximida.

-  $0,128 \pm 0,037$  pmoles/ $10^6$  células en las preincubadas con glucagón (  $4 \times 10^{-8}$  M ).

-  $0,11 \pm 0,01$  pmoles/ $10^6$  células en las preincubadas con cicloheximida ( 1 µg/ml ) y

-  $0,057 \pm 0,012$  pmoles/ $10^6$  células en las que se preincubaron con glucagón y cicloheximida a las concentraciones anteriores.

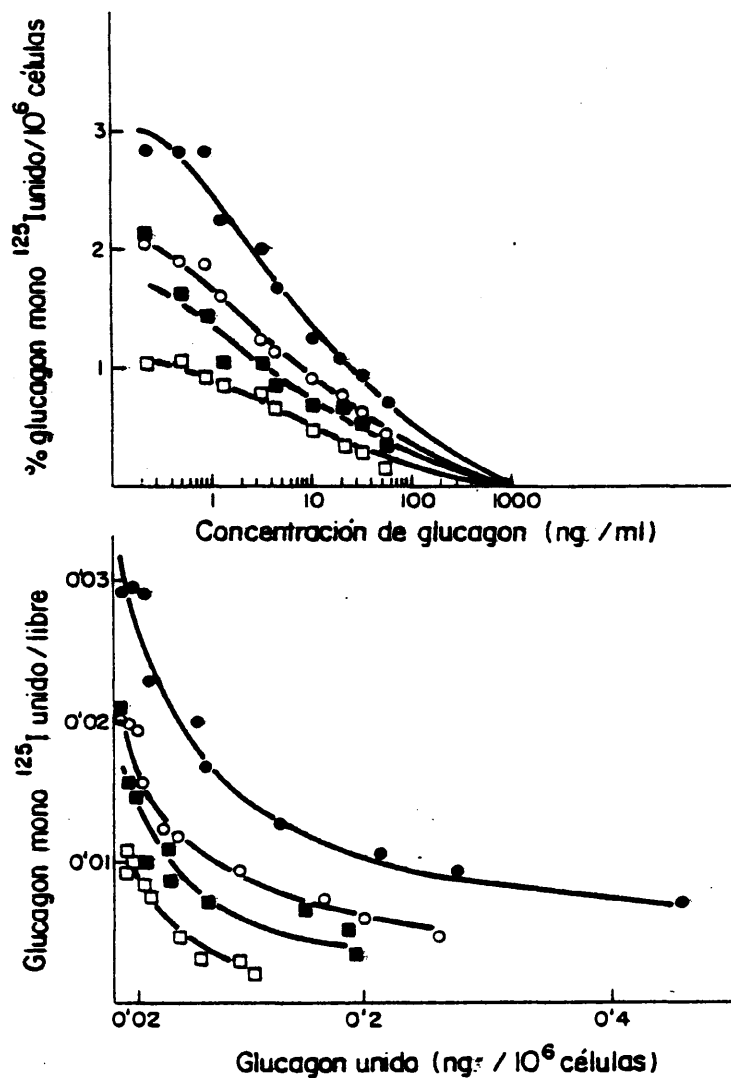


FIGURA 25.- UNION DE GLUCAGON A HEPATOCITOS PREINCUBADOS CON O SIN GLUCAGON, CON CICLOHEXIMIDA, O CON GLUCAGON Y CICLOHEXIMIDA. Los hepatocitos se preincubaron 6 horas en medio 199 a  $37^\circ\text{C}$  sin ( $\bullet$ — $\bullet$ ) o con glucagón  $4 \times 10^{-8}\text{M}$  ( $\circ$ — $\circ$ ), con cicloheximida  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  ( $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ) o con glucagon más cicloheximida ( $\square$ — $\square$ ) y después de lavados se incubaron a  $20^\circ\text{C}$  en KH tris albúmina al 1% pH 7,4 con mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón ( $0,16\text{ ng/ml}$ ) y diferentes cantidades de glucagón - no marcado ( $0,3$ – $1000\text{ ng/ml}$ ), determinándose la unión específica a los 30 min. de incubación. Cada punto representa la media de 4 experimentos por duplicado.

Como puede verse el número total de sitios fue de un 67% en células preincubadas con glucagón con respecto a aquellas preincubadas sin él y sin cicloheximida. Si comparamos el número total de sitios de unión para glucagón en aquellas células preincubadas con cicloheximida y preincubadas con cicloheximida más glucagón, se observa que en estas últimas es de un 52% con respecto a las primeras, es decir, que a pesar de haber inhibido por completo la síntesis de proteínas, el efecto de glucagón sobre sus propios receptores se manifiesta.

#### 4.- NIVELES DE GLUCAGON, INSULINA Y GLUCEMIA EN RATAS CONTROLES Y TRATADAS.

Se determinaron los niveles de glucagón e insulina en plasma de sangre tomada en vena porta por radioinmunoensayo, y los niveles de glucosa en plasma de sangre proveniente de la vena cava inferior. Como puede observarse en la Tabla 5 los niveles de glucagón que bañan el hígado son directamente proporcionales a la cantidad de G-Z-P con que se inyectaron los animales. Sin embargo, no se alteran los niveles de insulina con el tratamiento con G-Z-P. Como puede observarse la glucemia es muy similar en todos los grupos de animales.

TABLA 5.- NIVELES CIRCULANTES DE GLUCAGON, INSULINA Y GLUCEMIA  
EN RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON 20, 40 y 60  $\mu$ G DE  
G-Z-P/100 G DE PESO. MEDIA  $\pm$  ERROR ESTANDAR N=10.

	C	T-20	T-40	T-60
Glucagón (pg/ml, en vena porta.	360 $\pm$ 63	850 $\pm$ 160	1200 $\pm$ 400	2800 $\pm$ 515
Insulina ( $\mu$ U/ml en vena porta)	61 $\pm$ 4	63 $\pm$ 5	56 $\pm$ 3	59 $\pm$ 5
Glucosa (mg/100 ml en vena - cava)	105 $\pm$ 7	130 $\pm$ 13	112 $\pm$ 10	105 $\pm$ 8



## DISCUSSION

Mecanismos de control para la concentración de una determinada hormona han sido descritos en humanos y animales de experimentación. Las hormonas por sí mismas pueden producir cambios en la concentración de sus propios receptores - ( regulación homotrópica ) o modificaciones en la población de receptores para otras hormonas ( regulación heterotrópica ). Regulación de la concentración de receptores por los niveles circulantes de la misma hormona han sido descritos para las catecolaminas, esteroides, glicoproteínas y hormonas polipeptídicas.

Aunque las concentraciones de receptores para glucagón cambian en diferentes situaciones fisiopatológicas, el papel que en ello juega el mismo es contradictorio. Ello creemos debido, al menos en parte, a que todos los estudios se realizaron "in vivo" y en esas circunstancias es difícil establecer una relación causa-efecto entre la hormona y su receptor. Por esta razón, nuestros estudios del efecto de glucagón sobre sus receptores en hígado los hicimos simultáneamente "in vivo" e "in vitro". De esta forma se puede determinar si los efectos de la hormona son directos o bien a través de las modificaciones metabólicas y hormonales que la misma pueda causar.

El primer problema que se plantea en el estudio de la interacción de una hormona con su receptor, es la utilización del material biológico más adecuado y de que la obtención del mismo se ha realizado en las condiciones idóneas. El mate-

rial que utilizamos fue : membranas plasmáticas de hígado y células aisladas por digestión con colagenasa.

Las membranas plasmáticas de hígado constituyen el material biológico más utilizado en el estudio de la interacción glucagón-receptor, sin embargo es un material heterogéneo en base a diversas propiedades, entre ellas su capacidad de unir y responder a glucagón de forma diferente ( WISHER y EVANS, 1975 y CHANG y col., 1975 ). Por otro lado durante el proceso de purificación de las membranas se pueden seleccionar, al menos en la última fase del proceso de purificación descrito por Neville ( NEVILLE, 1968 ), distintas subfracciones ( POHL y col., 1971 ) y según Katz ( KATZ y col., 1978 ) el sistema adenilato ciclasa sensible a epinefrina puede sufrir algunas alteraciones, de lo cual se desprende la necesidad de controlar de forma adecuada el proceso de purificación. Para ello determinamos en cada una de las etapas definidas en el proceso de purificación ( ver Material y Métodos ) la cantidad total de proteína y la actividad 5'nucleotidasa como marcadora de la fracción de membranas plasmáticas (BENEDETTI y EMMELOT, 1968 ). Con respecto a la actividad 5'nucleotidasa ( Tabla 1 ), esta fue igual en el homogenado hepático inicial de todos los grupos de animales ( ratas controles e inyectadas con 20, 40 y 60  $\mu$ g. de G-Z-P/100 g. de peso ) y el índice de purificación de dicho enzima al final del proceso fue de 9 veces en todos los grupos. La cantidad de proteína total obtenida en la fracción de membranas parcialmente purificadas

( Tabla 1 ) fue de unos 12 mg a partir de 10 g de hígado ( 2 g de proteína ) en todos los grupos. Parece por tanto que durante el proceso de purificación se recupera la misma cantidad de membranas en todos los grupos, y que las diferencias de actividad biológica y de unión de glucagón a dichas membranas no pueden ser explicadas en base a un artefacto creado por una selección sistemática de una u otra subfracción de membranas en los animales controles o tratados con G-Z-P. Por otra parte, y en comparación de lo obtenido en las membranas de los animales controles ( Tabla 2 ), la unión de glucagón fue inversamente proporcional a las dosis de G-Z-P inyectadas "in vivo" a los animales. Las diferencias observadas con la fracción de membranas fueron igualmente observables con la fracción de 1500xg e incluso en el homogenado inicial, a pesar de la pequeña cantidad de hormona unida en dicha fracción. Todo ello parece indicar que no existen diferencias con las subfracciones de las membranas de los diferentes grupos experimentales, especialmente porque la unión de insulina a su receptor ( Fig.9 ) fue semejante en todos los grupos, lo cual a su vez sugiere la especificidad del fenómeno.

Además, la obtención de resultados semejantes con hepatocitos aislados, descalifican las posibles críticas a los datos obtenidos con las membranas plasmáticas, aunque las células aisladas no están exentas de otros problemas. Desde la descripción detallada por Berry y Friend ( BERRY y

FRIEND, 1969 ) de la obtención de hepatocitos tras la perfusión del hígado con colagenasa, este método, dadas sus ventajas, ha sido generalmente utilizado. Sin embargo, en la fracción cruda de colagenasa normalmente utilizada hay abundantes proteasas ( MANDL y col., 1953 ) que colaboran en el proceso de digestión. Pero dado que se ha descrito que la actividad biológica de las hormonas es afectada por algunas proteasas - ( KONO, 1969 ) ya que alteran sus receptores ( CUATRECASAS, - 1971 ), podría pensarse que esto representa un grave inconveniente para los estudios de interacción de dichas células con las hormonas. Antes de que se describiera la utilización de la colagenasa para dispersar las células del tejido hepático, se utilizaron métodos mecánicos y sobre todo, métodos mecánicos - en presencia de agentes quelantes de calcio ( ANDERSON, 1953 ) o potasio ( RAPPAPORT y HOWZE, 1966 ) con lo que se evitan los inconvenientes antes reseñados. No obstante, las células aisladas con colagenasa retienen la sensibilidad a las hormonas - insulina, glucagón y epinefrina ( WAGLE e INGEBRETSEN, 1975 ) de una forma más eficaz que las células obtenidas por procedimientos mecánicos ( JOHSON y col., 1971 ). Además la ultraestructura de las células se mantiene perfectamente cuando se - aíslan por digestión por colagenasa como mostramos en la Fig.3.

En resumen parece claro que la utilización de las - membranas plasmáticas de hígado y los hepatocitos obtenidos - por digestión con colagenasa representan el material adecuado para estudiar las interacciones de glucagón con su receptores.

La vida media del glucagón es aún más corta que la de la insulina ( BERSON y col., 1957 y ASSAN, 1971 ) dado que el proceso de degradación de glucagón es muy rápido. Por tanto para lograr niveles constantes de glucagón exógeno en los animales de experimentación se necesitaría inyectar esta hormona con suma frecuencia o bien utilizar formas de glucagón de acción prolongada. Obviamente, utilizamos la segunda posibilidad e inyectamos glucagón en forma de suspensiones de glucagón-zinc-protamina ( G-Z-P ) que es la forma de glucagón de acción más prolongada ( TRADING y col., 1969 ). De esta forma, los niveles de glucagón se elevaron gradualmente, sin cambios bruscos, manteniéndose elevados durante 8 horas, con lo que sus efectos metabólicos se prolongan notablemente y se reducen al mínimo sus efectos secundarios sobre otras hormonas o metabolitos. Por tanto con inyecciones sucesivas de G-Z-P cada 8 h. se logró una hiperglucagonemia crónica en nuestros animales. La glucemia, los niveles de glucagón y de insulina en el momento de sacrificar los animales, a las 8 horas de la última inyección de G-Z-P los hemos presentado en la Tabla 5. Como puede observarse, la glucemia y los niveles de insulina en la vena porta no se modificaron sensiblemente, sin embargo, los valores de glucagón se encontraron elevados proporcionalmente a las cantidades de G-Z-P inyectadas. Estos valores de glucagón en vena porta fueron similares a los valores detectados en individuos normales tras la estimulación de su secreción ( BLACKARD y col., 1974 y MARPE y col., 1979 ) o a las concen-

traciones que se alcanzan en determinados estados patológicos ( ZENSER y col., 1974 y MALLISON y col., 1874 ).

Como hemos comentado anteriormente la unión del glucagón a su receptor en membranas plasmáticas o hepatocitos - aislados, fue menor en aquellos procedentes de animales en los que se había inyectado la hormona. Esta diferencia con relación a los datos de las ratas controles no es debida a una diferencia en el tamaño de las células procedentes de uno u otro grupo de animales, ya que estos son iguales:  $24 \pm 0,22 \mu\text{m}$  de diámetro en las procedentes de animales controles y  $22,8 \pm 0,17 \mu\text{m}$ . las procedentes de animales inyectados con  $40 \mu\text{g}$  . de G-Z-P/ 100 grs. de peso. Por tanto, la elevación crónica de los niveles circulantes de glucagón en la rata origina una disminución de la unión del mismo a sus receptores en los hepatocitos que son las células diana fundamentales para la expresión de la acción biológica del glucagón.

Además dicha disminución no parece debida a un efecto inespecífico del glucagón en relación a sus efectos catabólicos sobre el metabolismo proteico ( MARLISS y col., 1972 ) ya que otras actividades, tal como la actividad 5'nucleotidasa presente en las membranas plasmáticas de hígado permanece inalterada en el curso de la hiperglucagonemia crónica. Sin embargo, con el fin de comprobarlo de una manera más fehaciente, se determinó la unión de insulina a membranas hepáticas procedentes de animales controles e inyectados con  $40 \mu\text{g}$  de G-Z-P/ 100 g. de peso, observándose en ambos grupos ( Fig.9 ) la -

misma unión hormonal. Por tanto el efecto de glucagón en el tejido hepático es específico sobre su propio receptor y no afecta otras funciones de la membrana.

La disminución observada en la unión de glucagón a membranas hepáticas y hepatocitos de animales hiperglucagonémicos, con respecto a los controles, podría ser debida a una alteración de sus receptores, bien en su número o bien en su afinidad, o ambas; a una alteración del proceso de degradación de la hormona y/o el receptor. Para determinar la contribución, de las distintas causas señaladas, al efecto observado fue necesario realizar por separado un estudio del proceso de degradación y de la afinidad y número de los receptores para glucagón.

La degradación de glucagón es un proceso muy rápido y a través de él podría obtenerse una respuesta puntual a la hormona en los tejidos diana. El órgano que juega un papel más importante en la degradación de glucagón es el hígado ( ASSAN, 1972 ), encontrándose el sistema degradativo localizado en la membrana plasmática del hepatocito ( POHL y col., 1972 ). "In vitro" también se ha podido demostrar que la degradación de glucagón es muy rápida tanto en membranas como en hepatocitos aislados, y puede ser responsable de la disminución de la unión de glucagón a su receptor en concentraciones por debajo de las saturantes ( DESBUQUOIS y col., 1974 ), de forma que la afinidad del glucagón por su receptor aumenta cuando se utilizan agentes capaces de inhibir su degradación.



Nuestros resultados indican ( Fig.6 ) que es un proceso fuertemente dependiente de la temperatura, sin embargo la degradación, tanto en membranas como en hepatocitos procedentes de ratas controles e inyectadas con 40  $\mu$ g de G-Z-P/100 g de peso, fue igual. Esto nos sugiere que el proceso de degradación del glucagón no contribuye en absoluto a las diferencias en la unión del mismo observadas entre ratas controles e inyectadas con G-Z-P.

En membranas hepáticas, el receptor de glucagón es inestable, ya que no se sintetiza pero sí se degrada, siendo un proceso dependiente de la temperatura. Por tanto, es necesario estudiar el proceso de degradación del receptor en membranas hepáticas procedentes de animales controles y animales hiperglucagonémicos para descartar que ello sea la causa de las diferencias observadas, o al menos parte de ellas, en la unión de glucagón a su receptor. La degradación del receptor en membranas resultó ser igual en las procedentes de animales controles e inyectados con 40  $\mu$ g de G-Z-P ( Fig.7 ).

La diferencia de unión de glucagón a ratas hiperglucagonémicas con respecto a ratas controles es debida, por tanto, a una alteración en la población de sus receptores. Para dilucidar si la alteración es debida a un cambio en la afinidad de la hormona por el receptor, a una disminución en el número de receptores o de ambos, llevamos a cabo un estudio cinético de la unión de glucagón a su receptor en membranas

hepáticas y hepatocitos.

La asociación de glucagón a sus receptores en membranas hepáticas en relación al tiempo de incubación, sigue la misma dinámica en controles y en procedentes de animales inyectados con 40  $\mu$ g de G-Z-P/100 g de peso ( Fig. 4 ), tanto a 10°C como a 20°C, alcanzándose la unión máxima a las 4 horas y 3 horas, respectivamente. En hepatocitos a 20°C la cinética de asociación de glucagón a su receptor fue igual también en ambos grupos de animales ( Fig.11 ). Sin embargo, a diferencia de lo observado con membranas, la unión máxima se alcanzó en un tiempo mucho más corto, lo que creemos debido a la diferencia existente entre hepatocitos y membranas en cuanto a la cinética de disociación del glucagón de su receptor.

La disociación en membranas del glucagón previamente unido a su receptor es muy lenta ( Fig.5 ), siendo igual en membranas controles y de animales inyectados con G-Z-P. La baja disociación del glucagón en membranas es un hecho descrito con anterioridad ( RODBELL y col., 1971 ), habiendo observado los mismos autores que aumenta con la adición de EDTA, - lo que sugiere que el ión calcio juega un cierto papel en el proceso de unión del glucagón a su receptor. Sin embargo este bajo proceso de disociación no se corresponde con la rápida desaparición del efecto de glucagón cuando este es eliminado del medio ( EXTON y col., 1971 ). No obstante, el proceso de disociación del glucagón de su receptor en hepatocitos es mu-

cho más rápido( Fig. 12 ), lo que parece más adecuado a la realidad de la acción hormonal, siendo en ambos casos, es - decir, para células procedentes de animales controles e inyectados con 40  $\mu\text{g}$ . de G-Z-P/100 g de peso. Las diferencias observadas en el proceso de disociación en membranas y hepatocitos pueden ser debidas al papel que en el proceso - de unión de glucagón a su receptor juegan los nucleótidos - de guanina ( RODBELL y col., 1971, HAMMES y RODBELL, 1976 y WELTON y col., 1977 ). Otro aspecto interesante que es necesario resaltar en el proceso de disociación es el hecho de que para insulina se ha descrito la existencia de cooperatividad negativa en la unión de la hormona al receptor ( De MEYTS y col., 1976 y De MEYTS y col., 1973 ). Lo cual se pone de manifiesto durante el proceso de disociación, ya que en presencia de altas concentraciones de hormona el proceso de disociación se acelera. Sin embargo , dicho fenómeno de cooperatividad negativa no se ha podido poner de manifiesto para glucagón ( SONNE y GLIEMANN., 1977 ). En nuestro caso la disociación en membranas fue igual en ausencia o presencia de glucagón, y ello a pesar de que la concentración de glucagón empleada fue de 1  $\mu\text{g}$ ./ml, que es la más efectiva en el caso de la insulina, y las temperaturas empleadas de 10° y 20°C que en el caso de la insulina son también de gran efectividad - ( De MEYTS y col., 1976 ).

En hepatocitos aislados ( Fig. 12 ) la disociación en ausencia o presencia de glucagón no difiere significativa-

mente tanto en los controles como en los procedentes de animales inyectados con  $40 \mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g. de peso. Por tanto, nuestros resultados son coincidentes con los anteriormente reseñados en el sentido de que para glucagón no existe cooperatividad negativa.

Los cálculos de afinidad del glucagón por su receptor y del número total de receptores los hicimos a partir del estudio de la asociación de glucagón a su receptor en el equilibrio y con diferentes concentraciones de glucagón, representando los datos así obtenidos según Scatchard ( SCATCHARD 1949 ). De acuerdo con ello, la unión de glucagón a membranas de animales controles fue superior a la unión a las de animales inyectados con 20, 40 y  $60 \mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g. de peso, en todas las concentraciones de la hormona ensayadas ( Fig 8 ). Cuando se representaron según Scatchard dichos datos se obtuvieron curvas cóncavas paralelas todas ellas, lo que sugiere que no existen cambios en la afinidad de la hormona por el receptor en membranas de ratas controles y tratadas con G-Z-P. Hallazgos semejantes se obtuvieron con los hepatocitos ( Fig. 14 ), siendo la unión de glucagón a hepatocitos - controles superior en todas las concentraciones de la hormona ensayadas, que la obtenida en hepatocitos procedentes de ratas inyectadas con  $40 \mu\text{g}$  de G-Z-P/100 g. de peso. Cuando se representaron los datos de unión de glucagón a hepatocitos según Scatchard, se obtuvieron dos curvas paralelas y cóncavas semejantes a las obtenidas con membranas. Por tanto, no parece

haber cambios en la afinidad de la hormona por el receptor en células, al igual que ocurre en membranas.

La interpretación de este tipo de curvas cóncavas obtenidas al hacer la representación de Scatchard, es difícil y problemática. Evidencia una heterogeneidad en la unión de la hormona al receptor, heterogeneidad puesta de manifiesto anteriormente en membranas hepáticas y hepatocitos ( RODBELL y col., 1971, SHLATZ y MARINETTI, 1972 y FREYCHET y col., 1974 ). Sin embargo, la heterogeneidad no es debida a que los receptores presenten cooperatividad negativa como en el caso de la insulina, ya que como hemos comentado anteriormente el receptor de glucagón no manifiesta dicha cooperatividad negativa. Por tanto, la heterogeneidad manifestada por glucagón en su unión al receptor podría ser debida a que hubiera heterogeneidad en el receptor, bien porque haya más de un tipo de receptor o bien porque un mismo receptor pueda comportarse de manera diferente en función de sus circunstancias ambientales, o bien porque haya heterogeneidad en la hormona. En cuanto a la hormona parece difícil que pudiera explicar la heterogeneidad observada, a pesar de que algunos autores ( LIN y col., 1976 ) han demostrado que a pH fisiológico un 15% del resto tirosina iodado de glucagón está ionizado, y que según ellos esta forma de glucagón tendría una afinidad menor por el receptor que la forma no ionizada. Sin embargo, es difícil que esto pueda explicar la heterogeneidad observada ya que a un pH en que prácticamente nada está ionizado -

muestra la misma heterogeneidad en la interacción con el receptor ( SONNE y col., 1978 ). Otra posibilidad sería que el comportamiento de la hormona iodada fuera diferente al de la hormona sin iodar, sin embargo, esto no podría explicar una diferencia cualitativa, sino solo cuantitativa. La heterogeneidad observada en la unión de glucagón a su receptor se debe, por tanto, a una heterogeneidad del mismo receptor, bien porque haya más de un receptor o bien porque el mismo receptor se pueda comportar de distinta forma en función de sus circunstancias. Ello además viene avalado, aunque de una forma indirecta, por el hecho de que al disociar la membrana con detergentes no iónicos se encuentran más de un componente de la misma capaz de unir glucagón ( GIORGIO y col., 1974, LEVEY y col., 1974, BREGMAN y LEVY, 1977 y WELTON y col., 1977 ). Aceptando esta interpretación de la existencia de dos receptores podemos calcular las dos afinidades correspondientes a los receptores de alta afinidad y pequeño número y la correspondiente a los de baja afinidad y alto número. Si así lo hacemos, los valores de las constantes de afinidad en las membranas son de  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y  $3,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  y en los hepatocitos  $0,62 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y  $0,55 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , siendo iguales para los hepatocitos y membranas procedentes de animales controles e inyectados con G-Z-P. Como vemos, a una misma temperatura de  $20^\circ\text{C}$ , la afinidad de la hormona por el receptor es mayor en membranas que en hepatocitos, lo que creemos es debido a la menor disociación de las hormonas en membranas con respecto a las células. El número de recepto-

res totales para glucagón en membranas fue de 0,95, 0,71, - 0,59 y 0,4 pmoles/mg de proteína en las procedentes de animales controles y tratados con 20, 40, y 60  $\mu$ g de G-Z-P/100 g de peso, respectivamente. El número de sitios correspondientes a los receptores de alta afinidad fue de - aproximadamente un 15% del total de sitios de unión para glucagón. Para los hepatocitos, el número de sitios totales fue de 0,2 pmoles/ $10^6$  células y 0,137 pmoles/ $10^6$  células en los procedentes de animales controles y tratados con 40  $\mu$ g de G-Z-P, respectivamente, y de 0,023 y 0,0143 pmoles/ $10^6$  células respectivamente, los correspondientes a los receptores de alta afinidad.

Muchas hormonas llevan a cabo sus efectos metabólicos en los tejidos diana a través de la regulación que ejercen de la actividad adenilato ciclasa en los mismos, de tal forma que alteran los niveles intracelulares de AMPc y este actúa como segundo mensajero de las mismas en el interior de las células ( ROBISON y col., 1969 ). El glucagón actúa a través de la adenilato ciclasa ( EXTON y col., 1971 ) y su acción sobre la misma ha sido ampliamente caracterizada por el grupo de Rodbell en adipocitos y membranas hepáticas obtenidas según el procedimiento de Neville ( BIRNBAUMER y RODBELL, 1969, RODBELL y col., 1970, POHL y col., 1969, POHL y col., - 1971 y RODBELL y col., 1971 ).

Para determinar si la alteración en el número de receptores para glucagón altera la sensibilidad de la célula he-

pática al mismo, determinamos, por tanto, la actividad adenilato ciclasa tanto en células como en membranas. Ello es indispensable ya que como veremos más adelante, los resultados de los distintos autores son contradictorios y algunos han sugerido que un pequeño número de los receptores para glucagón existentes son suficientes para obtener una activación máxima de la adenilato ciclasa ( BIRNBAUMER y POHL., 1973 y ROSSSELIN y col., 1974 ). Determinamos la actividad adenilato ciclasa en membranas y hepatocitos en presencia de teofilina ( BUTCHER y SUTHERLAND, 1962 ) que inhibe, aunque no totalmente, la actividad fosfodiesterasa que degrada el AMPc y está presente en membranas y células hepáticas ( SUTHERLAND y RALL, 1958 ). La estimulación por glucagón de la actividad adenilato ciclasa en células procedentes de animales controles fue mayor que en células procedentes de ratas inyectadas con 40 µg. de G-Z-P/100 g. de peso ( Fig.15 ), como corresponde a un mayor número de receptores para glucagón en las primeras. Además la diferencia fue de la misma magnitud que la diferencia observada en la unión de glucagón a su receptor. Sin embargo, dicha diferencia no solo podría ser debida a la diferencia observada en la unión de glucagón, sino también a una diferencia en la actividad por sí de la adenilato ciclasa en unas y otras células o a diferentes condiciones en el interior de unas y otras, como pudiera ser por ejemplo una distinta disponibilidad del sustrato del enzima. Sin embargo, esta última posibilidad no parece posible, ya que esa misma diferencia se observó en las membranas ( Fig.10 ), que durante



el ensayo están en las mismas condiciones con independencia de su origen. Cuando se estimuló en membranas la actividad adenilato ciclasa con NaF ( BIRNBAUMER y col., 1971 ), la respuesta fue igual en las procedentes de animales controles y en las procedentes de animales inyectados con 40 µg de G-Z-P/100 g de peso. Esto unido a que la actividad basal es igual en ambos grupos sugiere que la actividad adenilato ciclasa por sí no está modificada en los animales tratados.

Podría pensarse también que la disminución de la actividad adenilato ciclasa en membranas y hepatocitos de ratas hiperoglucagónicas con respecto a los procedentes de ratas controles podría deberse a una falta de acoplamiento o a un acoplamiento defectuoso entre el complejo hormona-receptor y la adenilato ciclasa. Esta posibilidad nos parece menos probable dado que las curvas de respuesta de la adenilato ciclasa frente a la concentración de glucagón en membranas y hepatocitos fue igual en ambos grupos. Si calculamos la concentración de glucagón capaz de producir un 50% de la estimulación máxima de la adenilato ciclasa observamos que es igual para ambos grupos, siendo de  $3 \times 10^{-9}$  M en membranas y  $2 \times 10^{-9}$  M en células. Además, la respuesta de la adenilato ciclasa a L-adrenalina es igual en células controles y preincubadas con glucagón.

Uno de los efectos biológicos más sobresalientes de glucagón sobre los hepatocitos es la estimulación de la producción de glucosa, bien por neoglucogénesis o glicogenolisis.

Con objeto de evaluar si la reducción en el número de receptores y en la actividad adenilato ciclasa por glucagón en las ratas tratadas con esta hormona tenía su expresión en la producción de glucosa, estudiamos esta a partir de alanina ( 10 mM ) en hepatocitos controles y procedentes de animales tratados con 40 µg de G-Z-P/100 g de peso. La producción de glucosa estimulada por glucagón (  $5,5 \times 10^{-7}$  M ) en hepatocitos controles fue de forma estadísticamente significativa mayor que en los procedentes de ratas inyectadas con G-Z-P a partir de la primera hora de incubación. Esta diferencia podría ser debida a una menor respuesta de los hepatocitos de ratas tratadas con G-Z-P, dado que los niveles intracelulares de AMPc alcanzados en respuesta al glucagón son menores o bien podría ser debida a diferencias en la situación metabólica de unas u otras células. Por otra parte, no siempre es necesaria una máxima respuesta de la adenilato ciclasa para alcanzar la máxima respuesta de otra actividad metabólica regulada por los niveles intracelulares de AMPc (MOYLEY y col., 1978 ). Para descartar esta última posibilidad, estudiamos la producción de glucosa en los hepatocitos de ratas tratadas y controles con AMPc ( 0,8 mM ). Los resultados obtenidos ( Tabla 4 ) indican que la menor producción de glucosa por estos hepatocitos es debido a una menor producción de AMPc endógeno en respuesta al glucagón.

Nuestros resultados son consistentes con la idea de que niveles elevados de glucagón inducen una disminución en -

el número de receptores para esta hormona en los hepatocitos, lo que da lugar a una "resistencia" de estos a la acción de la hormona. Esta correspondencia en nuestros resultados contrasta con las descripciones contradictorias que sobre este tema existen en la literatura científica. Durante el ayuno - los niveles circulantes de glucagón se elevan ( AGUILAR-PARADA y col., 1969 ) lo cual ha sido relacionado ( FOUCHEREAU - PERON y col., 1976 ) con una disminución en el número de receptores para glucagón que se corresponde con una reducción en la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por glucagón. Sin embargo, se requiere una concentración de glucagón 4 veces superior en los hepatocitos de ratas ayunadas para - lograr una estimulación de la adenilato ciclasa 50% de la - estimulación máxima con respecto a la concentración necesaria para lograr lo mismo en hepatocitos de ratas comidas. Otros autores ( SRIKANT y col., 1977 ) observaron una disminución del número de receptores para glucagón en membranas hepáticas de ratas que habían ayunado durante 6 días, sin embargo, la estimulación de la actividad adenilato ciclasa por glucagón fue igual que en los controles. Los mismos autores estudiaron el efecto que poseen distintos grados de hiperglucagonemia - sobre las interacciones hormona-receptor encontrando que la disminución del número de receptores observada no se correspondía con el grado de hiperglucagonemia, siendo la disminución máxima en el caso de los animales ayunados y no resultando - afectada en ningún caso la actividad adenilato ciclasa estimu-

lada por glucagón. De todo ello parece deducirse que el ayuno no es la situación más adecuada para estudiar el efecto de glucagón sobre sus propios receptores, ya que dicho efecto puede estar enmascarado por los cambios metabólicos a los que se encuentran sometidos estos animales.

La diabetes es una situación patológica que frecuentemente cursa con hiperglucagonemia ( MULLER y col., 1971 ), y en ella podrían en principio, estudiarse los efectos de glucagón sobre su propio receptor. No obstante, los resultados son contradictorios. Según algunos autores la diabetes no tendría efecto alguno sobre la unión de glucagón a su receptor ( DAVIDSON y KAPLAN, 1977 y Le MARCHAND y col., 1976 ) y la actividad adenilato ciclasa está incrementada en respuesta a glucagón ( HEPP, 1972 ) con respecto a lo encontrado en ratas controles, mientras que la respuesta a NaF es semejante en ambos grupos de animales . Pilkis y col. ( PILKIS y col., 1974 ) encontraron que no existen diferencias en cuanto a la estimulación máxima de la adenilato ciclasa por glucagón, pero se requería una mayor concentración de la hormona para estimular un 50% la actividad enzimática en ratas diabéticas que en controles, y que la actividad fosfodiesterasa estaba disminuida en las diabéticas.

Otros autores sí han encontrado alteraciones en la unión de glucagón a su receptor en el tejido hepático de ratas diabéticas, aunque sus resultados puedan aparecer como contradictorios. Srikant y col. ( SRIKANT y col., 1977 ) encontraron

una disminución en el número de receptores paraglucagón en membranas plasmáticas de hígado , al igual que Bhathena y col - ( BHATHENA y col., 1978 ) lo encontraron en hepatocitos de ratas diabéticas. Sin embargo, otros autores ( SOMAN y FELIG, - 1978 ) han descrito un aumento muy marcado ( 95% ) en el número de receptores para glucagón en membranas plasmáticas de hígado de ratas diabéticas. Con respecto a la actividad adenilato ciclase estimulada por glucagón ( SRIKANT y col., 1977 ) - otro grupo de autores no detectaron ninguna alteración a pesar de la disminución en un 40% en el número de receptores paraglucagón, aunque estos autores no dan dato alguno sobre el proceso de purificación de las membranas. Bathena y col ( BATHENA y col., 1978 ) han descrito que la respuesta de la adenilato ciclase a glucagón es nula en los hepatocitos de ratas diabéticas, a pesar de que el número de receptores para glucagón solo disminuyó un 40% en ratas diabéticas, por último Soman y Felig - ( SOMAN y FELIG, 1978 ) han encontrado un incremento de la actividad adenilato ciclase estimulada por glucagón en las membranas de ratas diabéticas en correspondencia con el aumento en el número de receptores para el mismo encontrado. Estas discrepancias parecen indicar que los animales diabéticos no son los idóneos para estudiar las interrelaciones entre hiperglucagonemia, receptores y adenilato ciclase. Por otra parte esas discrepancias podrían ser mejor comprendidas a la luz de la diferente composición de las membranas hepáticas de ratas diabéticas frente a las membranas de controles ( CHANDRAMOULI y CARTER, 1975 y

DAVIDSON y KAPLAN, 1977 ) y también en la observación de que - el grado de hiperglucagonemia y alteraciones metabólicas en los animales diabéticos varían de unos estudios a otros, lo que nos sugiere que las diferencias en la situación metabólica de los animales puede contribuir a las diferencias observadas entre - unos y otros autores.

Otro modelo experimental utilizado para estudiar las relaciones entre niveles circulantes de glucagón y sus receptores ha sido descrito por Soman y Felig ( SOMAN y FELIG, 1977) en ratas nefrectomizadas. Estos autores encontraron un aumento de un 100% en el número de receptores para glucagón, con el aumento correspondiente en la actividad adenilato cilasa estimulada por dicha hormona y una disminución en la concentración de receptores para insulina. En dichas ratas los niveles de insulina y glucagón inmunoreactivo circulante se encuentran elevados, lo que podría sugerir que la hiperglucagonemia induciría un aumento en el número de receptores de glucagón, al - igual que ocurre con la prolactina ( POSNER y col., 1975 ). No obstante, y a pesar de que algunos autores han encontrado un - ligero aumento en la fracción de glucagón de peso molecular 3500 en las ratas nefrectomizadas ( EMMANOUEL y col., 1976 ) parece ser que la fracción molecular de glucagón causante de la hiperglucagonemia es la de peso molecular 9000 ( KUKU y col., 1976 y VALVERDE y col., 1976 ) como consecuencia de una falta de degradación de esta forma inmunoreactiva por el riñón ( LEFEBVRE y LUYCKX, 1975 ). Bajo un punto de vista biológico la fracción -

de glucagón de peso molecular 9000 es inactiva ( RIGOPOULOU y col., 1970 ) ya que es incapaz de unirse al receptor de glucagón ( SRIKANT y col., 1977a ).

Hiper glucagonemias experimentales se han obtenido por infusión continuada de glucagón exógeno, pero de nuevo - los resultados obtenidos son discrepantes. Srikant y col. - ( SRIKANT y col., 1977 ) observaron una disminución en el número de receptores para glucagón en ratas inyectadas con 0,5 mgrs. de glucagón cristalino cada 12 horas, sin embargo, ello no se corresponde con una disminución en la actividad adenilato ciclase estimulada por glucagón. El problema más importante planteado por este trabajo es que, dado que la vida media del glucagón es muy corta, al inyectar glucagón cristalino cada 12 horas probablemente estemos más ante una situación de hiper glucagonemia aguda cada 12 horas que ante una hiper glucagonemia crónica, con todos los efectos secundarios que ello puede acarrear. Bhathena y col., ( BHATHENA y ol., 1978 ) han encontrado una disminución de un 30% en el número de receptores para glucagón en hepatocitos de ratas inyectadas con esta hormona, pero dicha disminución no se corresponde con la reducción ( 70% ) en la actividad de la adenilato ciclase estimulada por glucagón. También en este caso es criticable el no haber empleado una forma adecuada de glucagón de larga duración. Soman y Felig ( SOMAN y FELIG., 1978 ) logran la hiper glucagonemia por infusión continua de glucagón. A las 5 horas observan una disminución de un - 45% en el número de receptores para glucagón y de la actividad

adenilato ciclasa estimulada por glucagón en las membranas y además no observan cambios en la unión de insulina u hormona del crecimiento humana en las mismas membranas.

Mahmood y col. ( MAHMOOD y col., 1978 ) con formas de glucagón de actividad prolongada no observan disminución en el número de receptores para glucagón en ratas normales, observando un aumento en la actividad adenilato ciclasa estimulada por glucagón y no por NaF. Sin embargo, sí observaron una disminución en el número de receptores para glucagón en ratas obesas ( Zucker ), pero no se corresponde con una disminución en la actividad adenilato ciclasa estimulada por glucagón, que se encontraba aumentada.

De nuevo, todas estas discrepancias quizá podrían deberse a la concurrencia de otros factores metabólicos o endocrinos capaces de enmascarar el efecto del glucagón sobre sus propios receptores. De la acción de dichos factores hay ejemplos ya en la literatura científica para el caso concreto de glucagón y otras hormonas. En adipocitos y membranas de tejido adiposo de ratas adultas se observa una disminución en el número de receptores para glucagón ( LIVINGSTON y col., 1974 ) con respecto a lo obtenido en animales jóvenes. Además esto se acompaña de cambios en la actividad lipolítica y activación de la adenilato ciclasa ( COOPER y GREGERMAN, 1976 ). Sin embargo, en hígado no se observaron cambios ( LOCKWOOD y EAST, 1978 ). El hipertiroidismo cursa con un aumento del número de receptores para glucagón y su actividad lipolítica en adipocitos ( MADSEN



y SONNE, 1976 ). Los estrógenos en ratas hembras afectan la respuesta de la adenilato ciclasa a glucagón en hígado ( WEINSTEIN y col., 1979 ).

De lo anteriormente descrito se deduce que los estudios "in vivo" difícilmente pueden indicar un efecto directo - del glucagón sobre sus componentes receptor y efector. Esta fue la razón fundamental que nos llevó al desarrollo de un diseño - experimental en el que los hepatocitos previamente aislados se incuban "in vitro" durante determinados períodos de tiempo, en - presencia de la hormona u otro agente que se sospeche pueda poseer un efecto modificador sobre la concentración de receptores. Cuando estos estudios los realizamos en presencia de glucagón - ( $4 \times 10^{-8}$  M ) observamos una disminución en la unión de glucagón a su receptor ( Fig. 16 ), que fue detectable a partir de las 4 horas de incubación. Dicha disminución aumentó con el tiempo. En cambio con los hepatocitos incubados sin la hormona apreciamos un ligero aumento en la unión de glucagón, lo que sugeriría que al haber una falta completa de glucagón su número de receptores tendería a aumentar. Ello serviría de confirmación a los resultados antes obtenidos en presencia de la hormona. Sin embargo, esto no es así ya que el número de receptores a tiempo cero y a las 6 horas de incubación es el mismo.

Utilizando este sistema experimental hemos obtenido - la suficiente información para afirmar que la disminución de - receptores de glucagón es dependiente de la concentración de la

hormona empleada.

La disminución no parece que pueda explicarse por una alteración en la capacidad de degradar glucagón por parte de las células preincubadas con este ( $4 \times 10^{-8}$  M) con respecto a las preincubadas en su ausencia, ya que ambos grupos de células degradan mono  $^{125}\text{I}$ -glucagón en la misma medida (Fig.18). Asimismo por los estudios de unión de glucagón a células con diferentes concentraciones de la hormona, se deduce que la afinidad no ha sufrido ninguna variación en ambos grupos celulares y que el número de receptores para glucagón disminuye proporcionalmente con la cantidad de hormona con la que fueron preincubadas las células ( Fig.17 y 20 ). Cuando los datos así obtenidos se representaron según Scatchard ( Fig. 20 panel inferior ) se obtuvieron dos curvas cóncavas y paralelas, en las que calculamos las dos constantes de afinidad y los números de sitios totales y de alta afinidad. La constante de alta afinidad fue de  $0,75 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y la de baja afinidad de  $0,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , siendo igual en células preincubadas o no con glucagón. El número de sitios totales fue de  $0,2 \text{ pmoles}/10^6$  células para las preincubadas en ausencia de glucagón y  $0,128 \text{ pmoles}/10^6$  células en las preincubadas con glucagón, siendo de aproximadamente un 15% el número de sitios de alta afinidad en ambos casos.

Al igual que ocurre con las ratas tratadas "in vivo" con G-Z-P, con nuestro sistema "in vitro" obtuvimos una menor activación de la adenilato ciclase por glucagón, en las células

que habían sido preincubadas con la hormona ( Fig.21 ). Esta menor activación del enzima fue proporcional a la reducción en el número de receptores. Por otra parte, la respuesta máxima y 50% de la máxima se consiguió con las mismas concentraciones de hormona, tanto en células preincubadas en presencia o ausencia de glucagón. Ello sugiere que la adenilato ciclasa no se modifica por sí. En apoyo de ello se encuentra el hecho de que la respuesta a L-adrenalina de la adenilato ciclasa es igual en las células que se preincubaron en presencia de glucagón - que las que se preincubaron en su ausencia ( Fig.22 ), lo que sugiere que la actividad del enzima no está alterada ni tampoco su capacidad de responder a un complejo hormona-receptor - como es el formado por la L-adrenalina y su receptor.

Por otro lado, dicho efecto del glucagón sobre su receptor en células preincubadas en su presencia es específico, ya que cuando se determinó la unión de insulina a células preincubadas o no con glucagón durante 6 horas resultó ser igual en ambos ( Fig.19 ).

De todo ello se desprende que el efecto de glucagón sobre sus receptores en hepatocitos aislados, cuando estos se incuban durante tiempos largos en presencia de la hormona, es el mismo que cuando se inyecta glucagón a los animales de experimentación en forma crónica. Esto sugiere que el efecto de glucagón sobre sus receptores es directo y disipa las posibles dudas originadas por la existencia de datos contradictorios en la literatura científica sobre el efecto regulador del glucagón

sobre sus receptores en hepatocitos.

Las proteínas de la membrana, al igual que el resto de las proteínas celulares, están en equilibrio dinámico en función de sus tasas de síntesis y degradación ( SCHIMKE, 1975) siendo su vida media muy variable y, lo que es más importante en nuestro caso, dichas tasas de síntesis y degradación pueden modificarse en distintos estados fisiológicos y originar cambios en la concentración de las proteínas afectadas ( SCHIMKE, 1975 ). Con objeto de determinar cual de estas dos posibilidades era responsable del efecto del glucagón sobre sus propios receptores, estudiamos dicho efecto en células aisladas en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas como es la cicloheximida. Con ello se puede discriminar entre el efecto - que el glucagón pueda ejercer sobre la tasa de síntesis de su receptor y sobre la tasa de degradación.

La cicloheximida a una concentración de 1  $\mu\text{g}$  /ml - fue capaz de inhibir por completo la síntesis de proteínas - ( Fig.23 ) y estudiamos el efecto de glucagón sobre la unión del mismo a su receptor en células incubadas en presencia de cicloheximida a esa concentración. Se pudo observar que el - glucagón disminuía la unión de él mismo a su receptor incluso en presencia de una inhibición total de la síntesis de proteínas ( Fig.24 ) y que el efecto se ejercía, al igual que vimos anteriormente sobre el número de sus receptores ( Fig.25 ). - Por tanto ante una inhibición de la síntesis de proteínas el glucagón es capaz de ejercer su acción sobre sus propios recep-

tores en hepatocitos incubados durante ~~tiempos~~ largos, a diferencia de lo observado por otros autores en el efecto de insulina y hormona de crecimiento sobre sus receptores en monocitos humanos cultivados. En estos casos señalados, la síntesis de proteínas previa era necesaria para que ambas hormonas pudieran ejercer sus efectos ( GAVIN III y col., 1974 y LESNIAK y col., 1973 ). Además el efecto de glucagón sobre sus receptores en presencia y ausencia de cicloheximida es semejante, cuando se comparan con las células incubadas en ausencia de glucagón y cicloheximida en el primer caso y en ausencia de glucagón, pero presencia de cicloheximida en el segundo. Esto nos sugiere que el efecto del glucagón es sobre la degradación del receptor y no sobre su síntesis. De esta forma el efecto es más rápido y coincidente con los resultados que los autores antes indicados obtuvieron con insulina y hormona del crecimiento en monocitos humanos cultivados.

## C O N C L U S I O N E S

1.- La elevación crónica de los niveles de glucagón circulante en la rata provocan una disminución en la unión de glucagón a membranas hepáticas. Esta disminución es directamente proporcional a las concentraciones de glucagón circulantes.

2.- El efecto observado del glucagón sobre sus receptores es específico, ya que la actividad del enzima 5'nucleotidasa no se altera, ni tampoco la unión de insulina a membranas hepáticas donde se detectaron los cambios de unión de glucagón.

3.- La disminución de la unión de glucagón a membranas hepáticas de ratas hiper glucagonémicas es debida a una disminución en el número de receptores para esta hormona, ya que el proceso de asociación y disociación del glucagón es semejante en las membranas de ratas controles y tratadas. En cambio, las constantes de afinidad fueron iguales en todos los grupos estudiados. La degradación de la hormona y del receptor durante los períodos de incubación utilizados no contribuyen en absoluto a las diferencias observadas en la unión de glucagón, ya que ambos procesos son iguales en membranas hepáticas de animales controles e hiper glucagonémicos.

4.- Resultados semejantes se obtuvieron con hepatocitos aislados de ratas controles e hiper glucagonémicas. Es decir, observamos una disminución en la unión de glucagón a hepatocitos de ratas hiper glucagonémicas que se debe a una reducción en el -

número de receptores por célula y no a cambios de afinidad, - asociación, disociación o degradación del glucagón. El tamaño de los hepatocitos fue igual en ambos grupos de animales y por tanto la disminución en el número de receptores para glucagón por célula no estuvo relacionado con cambios en las dimensiones de la superficie celular. La disociación de la hormona desde - los hepatocitos fue mucho más rápida que en membranas, lo que puede ser un índice del efecto de los nucleótidos de guanina sobre el proceso de unión del glucagón a su receptor.

5.- La estimulación por glucagón de la actividad adenilato ciclasa en membranas hepáticas de ratas hiper glucagonémicas fue menor y proporcional a la disminución observada en el número - de receptores. Sin embargo, las actividades basal y estimulada por NaF fue igual que en las controles. La concentración de - glucagón capaz de producir una estimulación 50% de la activación máxima de la adenilato ciclasa fue la misma en membranas hepáticas procedentes de animales controles e hiper glucagonémicos. - Todo ello sugiere que no existe alteración alguna en la adenilato ciclasa y que la disminuida estimulación por glucagón se - debe a una reducción en el número de sus receptores.

6.- Cuando se estudió el acúmulo de AMPc en hepatocitos incubados con diferentes concentraciones de glucagón y en presencia de teofilina se observó una disminución en los hepatocitos procedentes de ratas hiper glucagonémicas. No se observaron alte-



raciones en los niveles basales de AMPc y la concentración de glucagón capaz de producir una acumulación 50% de la máxima - fue igual tanto en hepatocitos de ratas controles como hiper-glucagonémicas. Ello sugiere de nuevo que no existe defecto alguno en la actividad adenilato ciclasa.

Por otra parte, también se observó una disminución en la producción de glucosa estimulada por glucagón en las ratas tratadas con esta hormona, lo que no parece que sea debido a una alteración postreceptor ya que la respuesta fue igual - cuando se utilizó como estimulante de la producción de glucosa el AMPc.

7.- El efecto de glucagón sobre su propio receptor es directo ya que cuando se incubaron hepatocitos aislados con diferentes concentraciones de glucagón también se obtuvo una disminución en la unión de glucagón a dichos hepatocitos. Disminución que fue proporcional a la concentración de glucagón añadida al medio de incubación. El efecto fue observado ya a las 4 horas de incubación a 37°C y sin embargo, no se observó alteración en la unión de insulina a su receptor. La reducción observada se debió únicamente a una disminución en el número de receptores, no observándose alteración alguna en el comportamiento de dichos receptores ni en la capacidad de las células de degradar glucagón.

8.- Cuando se estudió el acúmulo de AMPc inducido por glu-

cagón en hepatocitos incubados anteriormente en presencia de la hormona durante 6 horas, se observó una disminución frente a lo obtenido con hepatocitos incubados en ausencia de hormona. Sin embargo, no observamos una respuesta modificada a otras hormonas como la adrenalina. Esto nos sugiere que no existen diferencias en la adenilato ciclasa, ni en su capacidad de ser estimulada por hormonas diferentes del glucagón.

9.- Cuando los hepatocitos se incubaron con una concentración de cicloheximida capaz de inhibir por completo la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -valina en las proteínas, se produjo una disminución de la unión de glucagón a dichas células. Cuando las células se incubaron con cicloheximida y glucagón, los efectos fueron aditivos, lo que sugiere: 1) que para que se manifieste el efecto de glucagón no es necesaria la síntesis de proteínas - 2) que el efecto del glucagón sobre su propio receptor se debe a un incremento de la tasa de degradación del receptor y no a un cambio en su biosíntesis.

## B I B L I O G R A F I A

AGUILAR-PARADA,E., EISENTRAUT,A.M. y UNGER,R.H. Diabetes 18: 717, 1969.

AHLQUIST,R.P. Ann.Rev.Pharmacol. 8:259, 1968.

ANDERSON,N.G. Science 117:627, 1953.

ANTONIADES,H.N. y GERSHOFF,S.N. Diabetes 15:655, 1966.

ARCHER,J.A., GORDEN,P. y ROTH,J. J.Clin.Invest. 55:166, 1975.

ARQUILLA,E.R., OOMS,H. y MERCOLA,K. J.Clin.Invest. 47:474,1968.

ASSAN,R. En: "Glucagon. Molecular physiology, clinical and - therapeutic implications". Pag.47. Ed. por P.J.Lefebvre y R.H. Unger. Pergamon Press, 1972.

AVRUCH,J. y WALLACH,D.F.H. Biochem.Biophys.Acta 233:334, 1971.

BATAILLE,D., FREYCHET,P. y ROSSELIN,G. Endocrinology 95: 713, 1974.

BANERJEE,P., CUATRECASAS,P. y SNYDER,S.H. J.Biol.Chem. 250:1427, 1975.

BEAVEN,G.H., GRATZER,W.G. y DAVIES,H.G. Eur.J.Biochem. 11:37, 1969.

BENEDETTI,C. y EMMETOT,P. En: "Ultrastructure in biological - systems", 4:33, ed. por A.J.Dalton y F.Haguenan. Academic Press 1968.

BENNETT,V. y CUATRECASAS,P. Biochem.Biophys.Acta 311:362,1973.

BENNETT,V. y CUATRECASAS,P. J.Membr.Biol. 22:1, 1975a.

BENNETT,V. y CUATRECASAS,P. J.Membr.Biol. 22:29, 1975b.

BENNETT,V. , O'KEEJE,E. y CUATRECASAS,P. Proc.Natl.Acad.Sci.  
(USA) 72:33, 1975.

BERGERON,J.J.M., EVANS,W.H. y GESCHWIND,I.I. J.Cell Biol. 59:  
771, 1973.

BERRY,M.N. y FRIEND,D.S. J.Cell Biol. 43:506, 1969.

BERSON,S.A., YALLOW,R.S. y BOLK,B.W. J.Lab.Clin.Med. 49:331,  
1957.

BATHENA,S.J., VOYLES,N.R., SMITH,S. y RECANT,L. J.Clin.Invest.  
61:1418, 1978.

BIHLER,D.A. y MORRIS,J.W.S. Biochem.J. 130:321, 1972.

BIRNBAUMER,L. y RODBELL,M. J.Biol.Chem. 244:3477, 1969.

BIRNBAUMER,L.,POHL,S.L. y RODBELL,M. J.Biol.Chem. 246:1857,  
1971.

BIRNBAUMER,L. y POHL,S.L. J.Biol.Chem. 248:2056, 1973.

BIRNBAUMER,L. En: "Receptors and hormone action" I:485. Ed.por  
B.W.O'Malley y L.Birnbaumer. Academic Press, 1977.

BIRNBAUMER,L., BEARER,C.F. y IYENGAR,R. J.Biol.Chem. 255:3552,  
1980.

BLACKARD,W.G., NELSON,N.C. y ANDREWS,S.S. Diabetes 23:199,1974.

BLACKARD,W.G., GUZELION,P.S. y SMALL,M.E. Endocrinology 103:  
548, 1978.

BLECHEN,N.M. y FISHER,R.B. J.Physiol. 123:260, 1954.

BLUNDELL,T., DODSON,G., HODGKIN,D. y MERCOLA,D. Advances in -

protein chemistry 26:279, 1972.

BLUNDELL, T.L., CUTFIELD, S.F., CUTFIELD, S.M., DODSON, E.J., DODSON, G.G., HODGKIN, D.C. y MERCOLA, D.A. Diabetes 21, supl. 2: 492, 1972a.

BLUNDELL, T.L. Trends in Biochem. Sci. 4:80, 1979.

BLUNDELL, T.L. Trends in Biochem. Sci. 4:151, 1979a.

BOLTON, A.E. y HUNTER, W.M. Biochem. J. 133:529, 1973.

BORNET, H. y EDELHOCH, H. J. Biol. Chem. 246:1785, 1971.

BEAVEN, H., GRATZER, W.B. y DAVIES, H.G. Eur. J. Biochem. 11:37, 1969.

BREGMAN, M.B. y LEVY, D. Biochim. Biophys. Res. Com. 78:584, 1977.

BROMER, W.W., SINN, L.G. y BEHRENS, O.K. J. Am. Chem. Soc. 79:2801, 1957.

BROMER, W.W., BOUCHER, M.E. y PATTERSON, J.M. Biochim. Biophys. Res. Com. 53:134, 1973.

BUTCHER, R.W. y SUTHERLAND, E.W. J. Biol. Chem. 237:1244, 1962.

COOPER, B. y GREGERMAN, R.I. J. Clin. Invest. 57:161, 1976.

CROFFORD, O.B. J. Biol. Chem. 243:362, 1968.

CUATRECASAS, P. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 63:450, 1969.

CUATRECASAS, P. e ILLIANO, G. J. Biol. Chem. 246:4938, 1971.

CUATRECASAS, P. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 68:1264, 1971.

CUATRECASAS, P. J. Biol. Chem. 246:6532, 1971a.

CUATRECASAS,P. J.Biol.Chem. 246:6522, 1971b.

CUATRECASAS,P. J.Biol.Chem. 247:1980, 1972.

CUATRECASAS,P. y TELL,G.P.E. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 71:485, 1973.

CUATRECASAS,P. Ann.Rev.Biochem. 43:169, 1974.

CUATRECASAS,P. y HOLLENBERG,M.D. Biochim.Biophys.Res.Com. 62: 31, 1975.

CUATRECASAS,P., JACOBS,S. y BENNETT,V. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 72:1739, 1975.

CZECH,M.P. Ann.Rev.Biochem. 46:359, 1977.

CHANDRAMOULI,V. y CARTER,J.R. Diabetes 24:257, 1975.

CHANG,K.I., BENNETT,V. y CUATRECASAS,P. J.Biol.Chem. 250:488, 1975.

CHANG,K.J., HUANG,D. y CUATRECASAS,P. Biochim.Biophys.Res.Com. 64:566, 1975a.

CHANNING,C.P. Proc.Soc.Expl.Biol.Med. 149:238, 1975.

CHEN,R.F. J.Biol.Chem. 242:173, 1967.

DAVIDSON,M.B. y KAPLAN,S.A. J.Clin.Invest. 59:22, 1977.

DeHAEN,C. J.Biol.Chem. 249:2756, 1974.

De MEYTS,P., ROTH,J., NEVILLE,D.M.,Jr., GAVIN III,J.R. y LES-  
NIAK,M.A. Biochim.Biophys.Res.Com. 55:154, 1973.

De MEYTS,P., BIANCO,A.R. y ROTH,J. J.Biol.Chem. 251, 1877,1976.

DESBUQUOIS,B. y CUATRECASAS,P. Nature ( New Biol. ) 237:202,  
1972.

DESBUQUOIS,B., LANDAT,M.H. y LANDAT,P. Biochim.Biophys.Res.Com.  
53:1187, 1973.

DESBUQUOIS,B., KRUG,F. y CUATRECASAS,P. Biochem.Biophys.Acta  
343:101, 1974.

DESBUQUOIS,B. Eur.J.Biochem. 53:569, 1975.

DIAL,L.K., MIYAMOTO,S. y ARQUILLA,E.R. Biochim.Biophys.Res.  
Com. 74:545, 1977.

DUFAN,M.L. y CATT,K.J. Nature ( New Biol. ) 242:246, 1973.

DUFAN,M.L., RYAN,D. y CATT,K.J. Biochem.Biophys.Acta 343:417,  
1974.

DUCKWORTH,W.C. Endocrinology 104:1758, 1979.

EASTMAN,R.C. J.Intern.Med. 86:212, 1977.

EISEN,H.J., GOLDFINE,I.D. y GLINSMANN,W.H. Proc.Natl.Acad.Sci.  
( USA ) 70:3454, 1973.

EISENTRAUT,A.M., WHISSEN,N. y UNGER,R.H. Am.J.Med.Sci. 225:137,  
1968.

EMMANOUEL,D.S., YASPAN,J.B., KUKU,S.F., RUBENSTEIN,A.H. y KATZ,  
A.I.J.Clin.Invest. 58:1266, 1976.

EPAND,R.M. y JONES,A.J.S. Biochim.Biophys.Acta 491:246, 1971.

EXLON,J.H., ROBISON,G.A., SUTHERLAND,E.W. y PARK,C.R. J.Biol.  
Chem. 246:6166, 1971.



FERREBEE, J.W., JOHNSON, B.B., MITHOEFER, J.C. y GARDELLA, J.W.  
Endocrinology 48:277, 1951.

FOUCHEREAU - PERON, M., RANCON, F., FREYCHET, P. y ROSSELIN, G.  
Endocrinology 98:755, 1976.

FREYCHET, P., ROTH, J. y NEVILLE, D.M., Jr. Proc. Natl. Acad. Sci.  
(USA) 68:1833, 1971.

FREYCHET, P., ROTH, J. y NEVILLE, D.M., Jr. Biochim. Biophys. Res.  
Com. 43:400, 1971a.

FREYCHET, P., KAHN, R., ROTH, J. y NEVILLE, D.M., Jr. J. Biol. Chem.  
247:3953, 1972.

FREYCHET, P., LANDAT, M.H., ROSSELIN, G., KAHN, C.R., GORDEN, P. y  
ROTH, J. FEBS Lett. 25:339, 1972a.

FREYCHET, P. J. Clin. Invest. 54:1020, 1974.

FREYCHET, P. y FORGUE, E. Diabetes 23 (supl.1):354S, 1974.

FREYCHET, P., ROSSELIN, G., RANCON, F., FOUCHEREAU, M. y BROER, Y.  
Horm. Metab. Res. supl.5: 72, 1974.

FREYCHET, P., BRANDENBURG, D. y WOLLMER, A. Diabetologia 10:1,  
1975.

FREYCHET, P. En: "Methods in receptor research" II:385. Ed. por  
M. Blecher. DeKker, 1976.

GARBERS, D.L. y JOHNSON, R.A. J. Biol. Chem. 250:8449, 1975.

GARRAT, C.J. Nature 201:1324, 1964.

GARRAT, C.J., CAMERON, J.S. y MENZINGER, G. Biochem. Biophys. Acta  
115:179, 1966.

GAVIN III, J.R., MANN, D.L., BUELL, D.N. y ROTH, J. Biochim. Biophys. Res. Com. 49:870, 1972.

GAVIN III, J.R., ROTH, J., NEVILLE, D.M., Jr., MEYTS, P. y BUELL, D.N. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71:84, 1974.

GAVIN III, J.R., GORDEN, P., ROTH, J., ARCHER, J.A. y BUELL, D.N. - J. Biol. Chem. 248:2202, 1975.

GIARALDI, T. y MARINETTI, G.V. Biochim. Biophys. Res. Com. 74:984, 1977.

GINSBERG, J.H., COHEN, R.M. y KAHN, C.R. Diabetes, suppl. 1:322, 1976.

GIORGIO, N.A., JOHNSON, C.B. y BLECHER, M. J. Biol. Chem. 249:428, 1974.

GLOSSMAN, H., BAUKAL, A.J. y CATT, K.J. J. Biol. Chem. 249:825, 1974.

GOLDFINE, I.D., GARDNER, J.D. y NEVILLE, D.M., Jr. J. Biol. Chem. - 246:6919, 1972.

GOOD, C.A., KRAMER, H. y SOMOGGI, M. J. Biol. Chem. 100:984, 1977.

HAMMES, G.C. y RODBELL, M. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73:1189, - 1976.

HARING, H., CALLE, C., BUG, A., RENNER, R., HEPP, K.D. y KEMMLER, W. Diabetologia 19:379, 1980.

HELENIUS, A. y SIMONS, K. Biochem. Biophys. Acta 415:29, 1975.

HEPP, K.D. Eur. J. Biochem. 31:266, 1972.

HEPP, K.D., LANGLEY, J., FUNCKE, H.J., RENNER, R. y KEMMLER, W. - Nature 258:154, 1975.

HERBERT,V., LAU,K.S., GOTTLIEB,C.W. y BLEICHER,S.J. endocrinology 25: 1375, 1965.

HINTZ,R.L., CLEMMONS,D.R., UNDERWOOD,L.E. y Van WYK,J.J. Proc. Natl,Acad.Sci. (USA) 69:2351, 1972.

HOUSLAY,M.D., ELLORY,J.C., SMITH,G.A., HESKETH,T.R., STEIN,J.M., WARREN,G.B. y METCALFE,J.C. Biochem.Biophys.Acta 467:208, 1977.

HUGGET,A.S.G. y NIXON,D.A. Lancet 2:368, 1957.

HUNTER,W.M. y GREENWOOD,F.C. Nature 194:495, 1962.

HUNZICKER-DUNN,M. y BIRNBAUMER,L. Endocrinology 99:198, 1976.

ILLIANO,G., TELL,G.P.E., SIEGEL,M.I. y CUATRECASAS,P. Proc.Natl. Acad.Sci. (USA) 70:2443, 1973.

IYENGAR,R., ABRAMOWITZ,J., BORDELON-RISER,M. y BIRNBAUMER,L. J.Biol.Chem. 255:3558, 1980.

IZZO,J.L., RONCONE,A., IZZO,M.J. y BALE,W.F. J.Biol.Chem. 239: 3749, 1964.

JARETT,M. y SMITH,R.M. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 72:3526, 1975.

JARETT,L. y SMITH,R.M. J.Supramol.Struct. 6:45, 1977.

JOHNSON,M.E.M., BUTCHER,F.P. y FAIN,J.N. J.Biol.Chem. 247:3227, 1972.

JOHNSON,L.B., BLECHER,M. y GIORGIO,N.A. Biochim.Biophys.Res.Com. 46:1035, 1972a.

JOST,J.P. y RICKENBERG. Ann.Rev.Biochem. 40:741, 1971.

KAHN,C.R., NEVILLE,D.M.,Jr. y ROTH,J. J.Biol.Chem. 248:244, -

1973.

KAHN,C.R., FREYCHET,P., ROTH,J. y NEVILLE,D.M.,Jr. J.Biol.Chem. 249:2249, 1974.

KAHN,C.R. En : Methods in membrane biology 3:81. Ed. por E.D. Korn. Plenum Press, 1975.

KAHN,C.R. J.Cell Biol. 70:261, 1976.

KAHN,C.R., GOLDFINE,I.D., NEVILLE,D.M.,Jr., De MEYTS,P. Endocrinology 103:1054, 1978.

KASUGA,M., KAMUNA,Y.A., IWAMOTO,Y. y KOSAKA,K. Endocrinology - 100:1384, 1977.

KATZ,M.I., KALISH,M.A., PINEGRO,M.A. y GREGERMAN,R.I. Biochem. Biophys.Acta 540:205, 1978.

KATZEN,H.M. y VLAHAKES,G.J. Science 179:1142, 1973.

KLEIN,I., FLETCHER,M.A. y LEVEZ,G.S. J.Biol.Chem. 248:6841, - 1973.

KONO,T. J.Biol.Chem. 244:1772, 1969.

KRUG,V., KRUG,F. y CUATRECASAS,P. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) - 69:2604, 1972.

KUKU,S.F., ZEIDLER,A, EMMANOUEL,D.S., KATZ,A.I., RUBENSTEIN,A.H. LEVIN,N.W. y TELLO,A. J.Clin.Endocr.Metab. 42:173, 1976.

LAMBERT,B., SUTTER,B.C.J. y JACQUEMIN,C. Horm.Metab.Res. 4:149, 1972.

LANGLEY,J.N. J.Physiol. 33:374 (Londres), 1905.

LEE,N.D. Endocrinology 65:347, 1959.

LEFEBVRE,P.J. y LUYCKX,A.S. Metabolism 24:1169, 1975.

LEFKOWITZ,R.J., ROTH,J., PRICER,W. y PASTAN,I. Proc.Natl.Acad. Sci. 65:745, 1970.

Le-MARCHAND,Y., LOTEN,E.G.,ASSIMACOPOULOS-JEANNET,F.,FORGUE,F., FREYCHET,P. y JEANRENAUD,B. Diabetes 26:582, 1976.

LESNIAK,M.A., GORDEN,P., ROTH,J. y GAVIN III,J.R. J.Biol.Chem. 249:1661, 1974.

LESNIAK,M.A. y ROTH,J. J.Biol.Chem. 251:3720, 1976.

LEVEY,G,S. Biochim.Biophys.Res.Com. 38:86, 1970.

LEVEY,G.S. J.Biol.Chem. 246:7405; 1971.

LEVEY,G.S., FLETCHER,M.A., KLEIN,I., RUIZ,E. y SCHENK,A. J.Biol. Chem 249:2665, 1974,

LIN,M.C., WRIGHT,D.E., KRUG,V.J. y RODBELL,M. Biochemistry 14: 1559, 1975.

LIN,M.C., NICOSIA,S. y RODBELL,M. Biochemistry 15:4537, 1976.

LIVINGSTON,J.N., CUATRECASAS,P. y LOCKWOOD,D.H. J.Lip.Res. 15: 26, 1974.

LIVINSGTON,J.N., PURVIS,B.J. y LOCKWOOD,D.H. Metabolism 27: - 2009, 1978.

LOCKWOOD,D.H. y EAST,L.E. Diabetes 27:589, 1978.

LOPEZ-QUIJADA,C., GOMEZ-ACEBO,J. y CANDELA,J.L.R. Diabetología 2:110, 1966.

LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L. y RANDALL,R.J. J.Biol. -

Chem 193:265, 1951.

MADSEN,S.N. y SONNE,O. Nature 262:793, 1976.

MAHMOOD,M.A., WOOD,P.J. y MARKS,V. Diabetologia 14:405, 1978.

MALLISON,C.N., BLOOM,S.R., WARIN.A.P., SALMON,P.R. y COX,B. -  
Lancet 2:1, 1974.

MANDL,I., MACLENNAM,J.D. y HOWES,E.L. J.Clin.Invest. 32:1323,  
1953.

MARLISS,E.B., AOKI,T.T. y CAHILL,G.F.,Jr. En : "Glucagon. Molecular physiology, clinical and therapeutic implications" pag. 123, ed. por P.J.Lefebvre y R.H.Unger. Pergamon Press, 1972.

MARRE,M., BOBBIONI,E., SUAREZ,M., REACH,G., DUBOIS,M.P. y ASSAN,  
R. Diabetes 28:213, 1979.

Mc DONALD,J.K., CALLAHAN,P.X., ZEITMAN,B.B. y ELLIS,S. J.Biol.  
Chem. 244:6199, 1969.

MEGYESI,K., KAHN,C.R., ROTH,J., NEVILLE,D.M.,Jr., NISSLEY,P.S.,  
HUMBEL,E.R. y FROECH,E.R. J.Biol.Chem. 250:8990, 1975.

MORAN,N.C. Pharmacol.Rev. 18:503, 1966.

MORRISON,M.,y BAYSE,G.S. Biochemistry 9:2995, 1970.

MOYLE,W.R., LEE,E.Y., BAHL,O.P. y RODBARD,D. En: Receptors and hormone action III: 221, ed. por B.W.O'Malley y L.Birnbaumer,-  
Academic Press, 1978.

MULLER,W.A., FALOONA,G.R. y UNGER,R.H. J.Clin.Invest. 50:1992,  
1971.

NAJJAR,V.A. y CONSTANTOPOULOS,A. Mol.Cell Biochem. 2:87, 1973.

NEVILLE,D.M.,Jr. Biochem.Biophys.Acta 154:540, 1968.

NEVILLE,D.M.,Jr. y KAHN,C.R. En: Methods in molecular biology 5:57, ed. por A.I.Laskin y J.A.Last. Dekker, 1974.

NEVILLE,D.M.,Jr. En: Methods in membrane biology 3:1, ed. por E.D.Korn. Plenum Press, 1975.

NOTTEY,J.J. y ROSSELIN,G. C.R.Acad.Sci. (Paris) 273:2118, 1971.

OLEFSKY,J.M. y REAVEN,G.M. J.Clin.Invest. 54:1323, 1974.

OLEFSKY,J.M., JOHNSON,J., LIN,F., EDWARDS,P.E. y BAUR,S. Diabetes 24:801, 1975.

OLEFSKY,J.M., JOHNSON,J., LIN,F., YEN,Ph. y REAVEN,G.M. Metabolism Clin. and Exp. 24:517, 1975a.

PASTAN,I., ROTH,J. y MACHIA,V. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 56:1882, 1966.

PFEUFFER,T. y HELMREICH,J.M. J.Biol.Chem. 250:867, 1975.

PILKIS,S.J., EXTON,J.H., JOHNSON,R.A. y PARK,C.R. Biochem.Biophys.Acta 343:250, 1974.

POHL,S.L., BIRNBAUMER,L. y RODBELL,M. Science 164:566, 1969.

POHL,S.L., BIRNBAUMER,L. y RODBELL,M. J.Biol.Chem. 246:1849, 1971.

POHL,S.L., KRANS,H.M.J., KOZYREFF,V., BIRNBAUMER,L. y RODBELL,M. J.Biol.Chem. 246:4447, 1971a.

POHL,S.L., KRANS,H.M.J., BIRNBAUMER,L. y RODBELL,M. J.Biol.Chem.

247:2295, 1972.

POSNER,B.I., KELLY,P.A. y FRIESEN,H.G. Proc.Natl.Acad.Sci. -  
(USA) 71:2407, 1974.

POSNER,B.I., KELLY,P.A. y FRIESEN,H.G. Science 188:57, 1975.

POTER,R.R. Biochemical J. 53:320, 1953.

RAO,C.V. y SAXENA,B.B. Biochem.Biophys.Acta 313:372, 1973.

RAPAPORT,C. y HOWZE,G.B. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 121:1010, 1966.

RENDELL,M., SALOMON,Y., LIN,M.C., RODBELL,M. y BERMAN,M. -  
J.Biol.Chem. 250:4235, 1975.

RENNER,R. FEBS Letters 32:87, 1973.

RIGOPOULOU,D., VALVERDE,I., MARCO,J., FALOONA,G.R. y UNGER,R,  
H. J.Biol.Chem. 245:496, 1970.

ROBINSON,G.A., BUTCHER,R.W. y SUTHERLAND,E.W. Ann.Rev.Biochem.  
34:149, 1969.

RODBELL,M. J.Biol.Chem.235:375, 1969.

RODBELL,M., BIRNBAUMER,L. y POHL,S.L. J.Biol.Chem. 245:718,  
1970.

RODBELL,M., BIRNBAUMER,L., POHL,S.L. y KRNAS,H.M.J. Acta Diab.  
Lat. 7 (Supl.1):9, 1970a.

RODBELL,M., KRANS,H.M.J., POHL,S.L. y BIRNBAUMER,L. J.Biol. -  
Chem. 246:1861, 1971.

RODBELL,M., BIRNBAUMER,L., POHL,S.L. y SUNDBY,F. Proc.Natl.  
Acad.Sci (USA) 68:909, 1971a.

RODBEL



RODBELL,M., KRANS,H.M.J., POHL,S.L. y BIRNBAUMER,L. J.Biol.Chem. 246:1872, 1971b.

RODBELL,M., BIRNBAUMER,L., POHL,S.L. y KRANS,H.M.J. J.Biol. Che. 246:1877, 1971c.

RODBELL,M., LIN,M.C. y SALOMON,Y. J.Biol.Chem. 249:59, 1974.

ROSSELIN,G., ASSAN,R., YALOW,R.S. y BERSON,S.A. Nature 212: 355, 1966.

ROSSELIN,G. y FREYCHET,P. Biochem.Biophys.Acta 304:541, 1973.

ROSSELIN,G., FREYCHET,P, FOUCHEREAU-PERON,M., RANCOM,F. y - BROER,Y. Horm.Metab.Res. 5 (supl):78, 1974.

ROTH,J. Metabolism, 22:1059, 1973,

ROY,C., BOCKAERT,J., RAJERISON,R. y JARD,S. FEBS Letters 0: - 329, 1973.

RUBALCAVA,B. y RODBELL,M. J.Biol.Chem. 248:3831, 1973.

RYLE,A.P., SANGER,F., SMITH,L.F. y KITAI,R. Biochemical J. - 60:541, 1955.

SASKI,K., DOCKERILL,S., ADANIAK,D.A. y TICKLE,I.J. Nature 257: 751, 1975.

SCATCHARD,G. Ann.N.Y.Acad.Sci. 51:660, 1949.

SCHIMMER,B.P., VEDA,K. y SATO,G.H. Biochim.Biophys.Res.Com. 32:806, 1968.

SCHIMKE,R.T. En: Methods in membrane biology3:201, ed. por E.D. Korn. Plenum Press, 1975.

SCHLESSINGUER,J., SCHECHTER,Y., WILLINGHAM,M.C. y PASTAN,I.  
Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 75:2659, 1978.

SEGLIN,P.O. J.Cell.Biol. 69:325, 1975.

SHIN,R.P.C. y FRIESEN,H.G. Biochem.J. 140:301, 1974.

SHLATZ,L., y MARINETTI,G.V. Science 176:175, 1972.

SOLL,A.H., GOLDFINE,I.D., ROTH,J., KAHN,C.R. y NEVILLE,D.M.,Jr.  
J.Biol.Chem. 249:4127, 1974.

SOLL,A.H., KAHN,C.R. y NEVILLE,D.M.,Jr. J.Biol.Chem. 250: 7402,  
1975,

SODOYEZ,J.C., SODOYEZ-GOFFANX,F., GOFF,M.M., ZIMMERMAN,A.E. y  
ARQUILLA,E.R. J.Biol.Chem. 250:4268, 1975.

SONNE,O. y GLIEMANN,J. Biochem.Biophys.Acta 499:259, 1977.

SONNE,O., BERG,T. y CHRISTOFFERSEN,T. J.Biol.Chem. 253:3203,-  
1978.

SOMAN,V. y FELIG,Ph. J.Clin.Invest. 60:224, 1977.

SOMAN,V. y FELIG,Ph. J.Clin.Invest. 61:552, 1978.

SOMAN,V. y FELIG,Ph. Nature 272: 829, 1978a.

SPIEGEL,A.M. y BITENSKY,M.W. Endocrinology 85:638, 1969.

SRIKANT,C.B., FREEMAN,D., Mc CORKLE,K. y UNGER,R.H. J.Biol.  
Chem. 252:7434, 1977.

SRIKANT,C.B., Mc CORKLE,K. y UNGER,R.H. J.Biol.Chem. 252:1847,  
1977a.

STADIE,W.C., HANGAARD,N., MARSH,J.B. y HILLS,A.G. Am.J.Med.Sci.

218:265, 1949.

STADIE,W.C., HANGAARD,N. y VAUGHN,M. J.Biol.Chem. 199:729, 1952.

STADIE,W.C., HANGAARD,N. y VAUGHN,M. J.Biol.Chem. 200:745, 1953.

STEINER,A.L., KIPNIS,D.M., UTIGER,R. y PARKER,C. Proc.Natl.Acad. Sci. (USA) 64:367, 1969.

STORM,D.R. y DOLGINOW,D. J.Biol.Chem. 248:5208, 1973.

SUTCLIFFE,H.S., MARTIN,J.J., EISMAN,J.A. y PILCZYK,R. Biochem.J. 134:913, 1973.

SUTHERLAND,E.W. y RALL,T.W. J.Biol.Chem. 232:1077, 1958.

SUTHERLAND,E.W. y RALL,T.W. Pharmacol.Rev. 12:265, 1960.

SUTHERLAND,E.W., RALL,T.W. y MENON,T. J.Biol.Chem. 237:1220, 1962.

SWANN,J.C. y HAMMES,G.G. Biochemistry 8:1, 1969.

TERRIS,S. y STEINER,D.F. J.Biol.Chem. 250:8389, 1972.

THORELL,J.I. y JOHANSSON,B.G. Biochem.Biophys.Acta 251:363,- 1971.

TRADING,F., NIELSEN,P., PINGEL,M. y VØLUND,A. Eur.J.of Pharma. 7:206, 1969.

TROSPER,T. y LEVY,D. Biochemistry 13:4284, 1974.

UNGER,R.H., EISENTRAUT,A.M., KELLER,S., LANZ,H.C. y MADISON, L.L. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 102:621, 1959.

VALVERDE,I. y VILLANUEVA,M.L. Metab.Clin.and Exp. 25:1393, 1976.

VARANDANI,P.T. Biochim.Biophys.Res.Com. 55:689, 1973.

VERRIER,B., FAYET,G. y LISSITZKY,S. Eur.J.Biochem. 42:355, 1974.

VIGNERI,R., GOLDFINE,I.D., WONG,K.Y., SMITH,G.J. y PEZZINO,V. J.Biol.Chem. 253:2098, 1978.

WAGLE,S.R. e INGEBRETSEN,W.R. Methods in Enzimology 35:579, 1975.

WEINSTEIN,I., FORTE,L.R., WERNER,H.V. y HEIMBERG,M. Biochim. Biophys.Res.Com. 86:454, 1979.

WELTON,A.F., LAD,P.M., NEWBY,A.C., YAMAMURA,H., NICOSIA,S. y RODBELL,M. J.Biol.Chem. 252:5947, 1977.

WRIGHT,M.H., HRUBY,V.J. y RODBELL,M. J.Biol.Chem. 253:6338, 1978.

WISHER,M.H. y EVANS,W.H. Biochemical J. 146:375, 1975.

WOHLTMANN,H.J. y NAHARA,H.T. J.Biol.Chem. 241:4931, 1966.

YALOWW,R.S. y BERSON,S.A. J.Clin.Invest. 39:1657, 1960.

ZELEZNIK,A.J., MIDGLEY,A.R. y REICHERT,L.E.,Jr. Endocrinology 95:818, 1974.

ZENSER,T.V., DeRUBERTIS,F.R., GEORGE,D.T. y RAYFIELD,E.J. Amer. J.Physiol. 277:1299, 1974.